

Aus der I. Inneren Abteilung d. Städt. Krankenhauses Berlin-Neukölln  
(Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. K. Holldack)  
und  
aus dem Institut für Hämatologie der GSF München, Assoziation mit  
EURATOM  
(Leiter: Prof. Dr. W. Stich)

---

DER EINFLUSS VON ERYTHROPOIETIN AUF  
MENSCHLICHES KNOCHENMARK IN VITRO

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an den

Medizinischen Fachbereichen der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Barbara Szantho von Radnoth geb. Langer

aus Kreuzburg/OS

1972



Aus der I. Inneren Abteilung d. Städt. Krankenhauses Berlin-Neukölln  
(Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. K. Holidack)  
und  
aus dem Institut für Hämatologie der GSF München, Assoziation mit  
EURATOM  
(Leiter: Prof. Dr. W. Stich)

---

DER EINFLUSS VON ERYTHROPOIETIN AUF  
MENSCHLICHES KNOCHENMARK IN VITRO

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Medizinischen Doktorwürde  
an den Medizinischen Fachbereichen  
der Freien Universität Berlin



vorgelegt von

Barbara Szanthy von Radnoth geb. Langer  
aus Kreuzburg/OS

28.11.1972

Referent: Professor Dr. med. Irene Bött

Korreferent: Professor Dr. med. H. Brücher



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen  
Fachbereiche der Freien Universität Berlin

Prämiert am: 28.11.1972

## INHALT

|                                                 | Seite |
|-------------------------------------------------|-------|
| I. Einleitung                                   | 1     |
| II. Material und Methode                        | 13    |
| III. Ergebnisse mit Abbildungen<br>und Tabellen | 29    |
| IV. Diskussion                                  | 60    |
| V. Zusammenfassung                              | 67    |
| VI. Literatur                                   | 68    |

## 1. Einleitung

### a) Historischer Überblick

Erstmals wurde im Jahre 1906 von CARNOT und DEFLANDRE (14) postuliert, daß im Blut anämischer Kaninchen ein Wirkstoff enthalten sein müsse, welcher die Erythropoese normaler Tiere nach subcutaner Injektion steigere. Sie nannten ihn "Hémopoïétine".

Ähnliche Beobachtungen machten nach SCHULZ (71) 1938 YU TIN TEI und 1943 KRUMDIECK.

Auf Initiative von BONSDORFF und JALAVISTO wurde 1948 die jetzt im internationalen Sprachgebrauch geläufige Benennung "Erythropoietin" eingeführt (10).

1960 unternahm VAN DYKE Versuche mit Erythropoietin, das aus menschlichem Urin gewonnen wurde.

In den letzten Jahren nahm das Interesse an dieser Substanz stark zu. Trotzdem konnte sie noch nicht rein dargestellt werden, da die Isolierung aus Plasma und Urin einen großen Arbeitsaufwand und große Mengen der Ausgangsstoffe Urin und Plasma erfordert (23).

### b) Definition und Eigenschaften des Erythropoietins

Erythropoietin, eine im Blut enthaltene Substanz, reguliert die Erythropoese entsprechend dem Sauerstoffbedarf des Organismus (53) und kann definitionsgemäß als Hormon ange-

sehen werden (51). Entsprechend der von REMMELE (67) 1968 für den deutschen Sprachraum eingeführten Schreibweise wird Erythropoietin als "ESF = erythropoiesestimulierender Faktor" bezeichnet.

Wie Versuche mit menschlichem ESF an Meerschweinchen zeigen, scheint es nicht artspezifisch zu sein (35).

#### c) Bildungsort

Beim Menschen werden ungefähr 90 % des Erythropoietins in der Niere gebildet (27, 58). Die restlichen ca. 10 % = extrarenales Erythropoietin entstammen anderen Organen, besonders der Leber und Milz (27, 59). Einige Tiere, z. B. Hunde, haben keine extrarenale Erythropoietinbildung (27).

Aufgrund verschiedenster Beobachtungen ist man heute der Ansicht, daß Erythropoietin nicht als einheitliche und von vornherein aktive Substanz vorliegt. So weisen GORDON und Mitarbeiter (40) in Nierenhomogenaten einen Stoff nach, welcher an sich inaktiv ist und erst im Plasma mit einem Globulin zusammen das aktive ESF bildet (Abb. 1). Sie finden diesen Stoff in der Fraktion der leichten Mitochondrien und Mikrosomen ("light mitochondrial and microsomal fraction"), nennen ihn "REF = renal erythropoietic factor" und postulieren seinen Enzymcharakter. Auch KURATOWSKA findet bei Durchströmungsversuchen von anoxischen Nieren mit

nicht eiweißhaltiger Perfusionsflüssigkeit keine ESF-Wirkung. Im Gegensatz zu GORDON findet sie jedoch REF in den Nierenzellkernen lokalisiert (52). ERSLEV kann die Ergebnisse GORDONS dagegen nicht bestätigen (22). Das extrarenale Erythropoietin soll nach Beobachtungen von FRIED sofort in aktiver Form vorliegen (27).

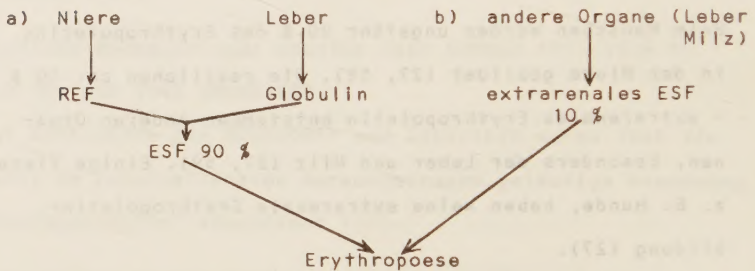


Abb. 1 Schematische Darstellung der Bildung von ESF, modifiziert nach Kubanek.

#### d) Regulation der ESF-Bildung

Die Menge der ESF-Produktion ist abhängig vom Verhältnis Sauerstoffbedarf zu Sauerstoffangebot (25, 26, 69). Durch Verminderung der Nierendurchblutung kann bei Hunden eine entsprechende Vermehrung des Plasmaerythropoietingehaltes erzeugt werden (26). Der Regelmechanismus spricht schon bei geringer Senkung des Sauerstoffgehaltes des Blutes an, bei Werten, weit über der kri-

tischen Schwelle für das Gesamtorgan. Die Rezeptoren scheinen in Geweben zu liegen, die besonders empfindlich auf Sauerstoffmangel reagieren.

Der normale ESF-Gehalt des Plasmas hängt von der Produktionsrate, der Metabolisierung und dem Verbrauch im Knochenmark ab. Nach allgemeiner Ansicht wird ESF zur Anregung der Erythropoese im Knochenmark verbraucht (16), obwohl NAETS und WITTEK in ausgedehnten Versuchen dies nicht bestätigen können (58). Der Plasmaspiegel des Menschen läßt sich nur indirekt schätzen. VAN DYKE et al. geben einen Wert von 0,5 IE/ml an (77), während andere Autoren nur 0,003 IE/ml annehmen (70). Eine Erhöhung der Erythropoietinproduktion und damit der REF-Produktion tritt in der Regel von einem Hb-Gehalt des Blutes um 7 (73) bis 9 g% oder einem Hämatokritwert von unter 15 % auf (57).

Die Bildung von ESF ist somit erhöht bei:

- 1.) Allen Anämieformen mit Ausnahme der nephrogenen Anämien.
- 2.) Aplastischen Anämien, wobei der ESF-Spiegel noch höher als bei gut regenerierenden Anämien ist, weil bei ihnen ESF im Knochenmark nicht verbraucht werden kann (30).
- 3.) Aufenthalt in großen Höhen als Folge des verminderten  $O_2$ -Partialdrucks.
- 4.) Nierentumoren
- 5.) Polyglobulien aus verschiedener Ursache aufgrund von innerem Sauerstoffmangel.

Eine Verminderung der ESF-Produktion wird bei schweren Schädigungen der Nierenfunktion beobachtet (24, 43). Bei nephrogenen Anämien ist demnach ESF nicht vermehrt, sondern oft sogar vermindert nachweisbar (32).

e) Gewinnung von ESF und seine chemischen Eigenschaften

Die Gewinnung von Erythropoietin erfolgt durch Isolierung aus Urin und Plasma von Mensch und Tier. Dabei sind große Mengen Ausgangsmaterial erforderlich, da ein erwachsener Mann unter physiologischen Bedingungen 1-5 IE/Tag, eine Frau 0,4-4 IE/Tag ausscheidet (1, 2, 77); allerdings bestehen dabei große Schwankungen.

Die chemische Reindarstellung ist bis jetzt weder bei REF noch bei ESF gelungen (23), obwohl GOLDWASSER und KUNG (37) aus dem Plasma anämischer Schafe ein hochgereinigtes ESF-Präparat gewinnen und seine Aktivität von 0,007 auf 6500 IE/ mg Protein steigern konnten.

Die Menge des erhaltenen Materials reicht jedoch nicht für die Strukturaufklärung aus.

Erythropoietin ist ein Glycoprotein mit hohem Gehalt an Neuraminsäure, Galaktose und Glukosamin. Es ist nicht dialysierbar, relativ hitzestabil und läuft

in der Elektrophorese mit der  $\alpha$ -Globulinfraktion zwischen  $\alpha_1$  und  $\alpha_2$ . Das Molekulargewicht wird mit Werten zwischen 10 000 (66) und 60 000 (37) angegeben.

Durch Trypsin, Pepsin, Papain und Fluoresceinisothiocyanat kann es *in vitro* und durch Neuraminidase *in vivo* inaktiviert werden. Im Organismus können neutralisierende und präzipitierende Antikörper dagegen gebildet werden.

Nach ERSLEV findet sich im partikelfreien Überstand von Nierenhomogenaten ein Hemmkörper gegen REF und ESF (22). Bei der Reaktion mit dem Hemmkörper, die nach stöchiometrischen Regeln ablaufen soll, verliert ESF seine biologischen und immunologischen Eigenschaften (22).

Auch WOLTERS weist das Vorkommen von erythropoese wirksamen Hemmfaktoren in menschlichem Plasma, Organhomogenaten und Zellfraktionen nach (78).

#### g) Nachweismethoden

Der Nachweis von Erythropoietin ist *in vivo* und *in vitro* zur Zeit nur in biologischen Testanordnungen möglich. Erythropoietin wird heute in internationalen Einheiten - IE gemessen, welche sich auf ein Standardpräparat der WHO beziehen. Eine IE ist definiert als die biologische Aktivität von 1,48 mg des internationalen Standardpräparates (15). Die IE stimmt mit den Einheiten des früher verwendeten Standard A und Standard B überein (15), auch ist sie ungefähr mit einer Kobalt-Einheit gleichzusetzen (79). Das Prinzip des Erythropoietinnachweises *in vivo* besteht darin, bei Tieren die eigene ESF-Produktion zu vermindern und dadurch die Erythropoese möglichst welt-

gehend zu unterdrücken, um sie dann durch Zufuhr von exogenem ESF wieder anzuregen. Erfahrungsgemäß eignen sich dazu Nagetiere, nachdem sie hypophysektomiert, subletal bestrahlt oder übertransfundiert sind. Auch durch Hungern läßt sich, besonders bei Ratten, die Erythropoese gut vermindern.

Die übertransfundierte, künstlich polyglobule Maus bewährt sich am besten, da sie am empfindlichsten reagiert. Mit ihr lassen sich noch Konzentrationen von 0,05 IE nachweisen (42), während bei der Hungerratte die Nachweisgrenze bei 0,5 E des Standardpräparates liegt.

Der Einbau von markiertem Eisen ( $\text{Fe}^{59}$ ) in die zirkulierenden Erythrozyten steigt proportional der verabreichten ESF-Menge an und dient in den meisten Fällen als Maß für die ESF-Wirkung. Diese wird somit indirekt über die Steigerung der Hämsynthese gemessen (39). Daneben bewährt sich auch die Bestimmung der  $\text{C}^{14}$ -Einbaurate in Häm (63), welche ebenfalls nach ESF-Gaben ansteigt.

Als weitere Kriterien werden Änderungen der Erythrozyten- und Retikulozytenzahl (39, 44, 50), der Erythrozyten- und Retikulozytengröße im peripheren Blut (12), des Hämatokrit (39), des Hb-Gehaltes und des Differentialknochenmarkausstrichs herangezogen (55). Neben direkten Messungen von Zellproliferation und Zellstoffwechsel im

perfundierten Knochenmark wird die Histologie von hämopoetischen Milzkolonien zur ESF-Kontrolle verwendet (50).

Die Untersuchungen in vitro werden an tierischem oder menschlichem Knochenmark durchgeführt:

SCHROEDER, GURNEY und WACKMAN geben 1958 eine Methode an, bei der die  $Fe^{59}$ -Inkorporation in Knochenmarksuspensionskulturen gemessen wird (72). Zahlreiche Untersucher wenden diese Methode in ihren Versuchen an, z. B. ERSLEV 1962 (19, 20), KRANTZ 1963 und 1968 (47, 48). FRIEDERICI stellt bei seinen Untersuchungen 1963 jedoch fest, daß auf diese Weise die ESF-Aktivität nicht sicher zu bestimmen ist. Es ist nicht zu entscheiden, ob die gemessene Radioaktivität von dem in den Erythroblasten der Kultur inkorporierten Eisen herrührt oder durch kolloidale, den Zellen aufgelagerte Eisenverbindungen bedingt ist (28).

Die Differentialzählung und mikroskopische Beurteilung der Zellmorphologie und ihrer Veränderungen unter Erythropoietineinfluß in Knochenmarksausstrichpräparaten bringt nach FRIEDERICI und GERSMEYER (1960) gute Ergebnisse (29). Da sie mit großem Zeitaufwand verbunden ist, wird sie jedoch selten angewandt.

#### h) Wirkungsmechanismus des ESF

- 1) Der Hauptangriffspunkt des ESF ist nach allgemeiner Ansicht die "determinierte" Stammzelle, das ist die Stammzelle, welche schon für die Erythropoese vor-

bestimmt ist, aber noch keinen morphologischen Anhalt dafür bietet. Erythropoietinsensibel wird sie zur Umwandlung in Proerythroblasten und zur Hb-Synthese angeregt (13, 21, 49, 74, 75). Ihre ESF-Empfindlichkeit wird durch die 5- $\Delta^2$ -H-Steroide, wie Etiocholanolon, Pregnanolon und Pregnandion erhöht, welche damit auch direkt auf die Erythropoese einwirken (60).

2) In schon differenzierten Erythroblasten wird die Hb-Synthese ebenfalls angeregt und damit ihre Ausreifung beschleunigt (57, 75, 76).

3) Vergleichende Erythrozytenzählungen ergeben, daß ESF die Ausschwemmung von Retikulozyten aus dem Mark beschleunigt und die periphere Erythrozytenzahl erhöht (18, 39, 50).

4) In Knochenmarkkulturen regt ESF die Neubildung von Häm (20, 34, 47), die DNS-Synthese (62, 64), den Einbau von Glucosamin ins Stroma (17, 62) und die Glykolyse an.

Vermutlich wirkt ESF als Derepressor und ermöglicht die Bildung von Messenger-RNS (17, 41), welche ihrerseits die Hb-Synthese in Gang setzt, indem Delta-Aminolävulinsäuresynthetase vermehrt gebildet wird (60). Letztere ist möglicherweise ein Schlüsselenzym der Häm-Synthese (45).

1) Beobachtungen anderer Autoren an Knochenmarkkulturen

Seit SCHROEDER und Mitarbeiter (1958) Untersuchungen über die ESF-Wirkung in Knochenmarkkulturen mittels  $\text{Fe}^{59}$ -Inkorporationsrate durchführten (72), haben viele Untersucher diese Methode angewandt, wie z. B. ERSLEV (1962) an Menschen- und Kaninchenknochenmark (19, 20), KRANTZ (1963) an Rattenknochenmark (47) und (1968) an menschlichem Knochenmark (48). Sie alle konnten nach Zugabe von ESF einen erhöhten Eiseneinbau feststellen und wiesen damit eine Steigerung der Häm-Synthese nach. FRIEDERICI dagegen hielt, wie schon zuvor erwähnt, die  $\text{Fe}^{59}$ -Inkorporationsrate für einen ungeeigneten Parameter (28). POWSNER und BERMAN maßen den Effekt von ESF auf Knochenmarkkulturen von Mensch und Tier mittels der  $\text{C}^{14}$ -Inkorporationsrate in Häm (63).

BORSOOK beschäftigte sich mit den morphologischen Veränderungen am Erythron und beobachtete das vermehrte Auftreten von Zellen der "Zelllinie 2". Bei diesen Zellen fand er eine Kern-Plasma-Relation wie bei basophilen Erythroblasten und einen Hb-Gehalt wie bei polychromatischen Erythroblasten. Auch stellte er fest, daß Aktinomycin D diese ESF-Wirkung verhindert (11). Danach muß ESF nicht nur auf die Stammzellen, sondern auch auf die differenzierten Erythroblasten wirken.

Nach Versuchen von ENGELBRECHT und REMMELE (18) wurde sogar die Retikulozytenreifung beschleunigt. GALLAGHER

et al. berichteten, daß sie in den Retikulozyten die  $\text{Fe}^{59}$ -Aufnahme durch ESF nicht erhöhen konnten (33).

Von GABUZDA et al. konnten differenzierte erythropoetische Zellen unter Zugabe von ESF als Wucherstoff bis zu 21 Tagen in Kultur erhalten bleiben (31).

Andere Autoren nahmen die Synthese von Globin, Nukleinsäure oder Eiweiß als Maßstab, indem sie biochemische Markierungen vornahmen (63).

MATOTH und Mitarbeiter untersuchten 1958 menschliches Knochenmark in Kulturen mit Zusatz von verschiedenen anoxischen Seren. Sie nahmen die weniger gebräuchlichen Gesamt- und Differentialzählungen und Zählungen der Erythroblasten verschiedener Reifegrade als Kriterien. Dabei fanden sie, daß bei erythropoietinreichen Seren die "frühen" und "mittleren" Erythroblasten und ihre Mitosen bis auf das 2,5-3-fache der Kontrollgruppen zunahmen (55). Außerdem setzten sie Suspensionskulturen von Knochenmark 2-6 E/ml Erythropoietin zu und bestimmten die Mitosezahl nach Colchicinzugabe (stathmokinetischer Test). Nach ihren Beobachtungen war für die ESF-Wirkung in vitro erforderlich, daß der Stoff so lange einwirkte, bis eine zweite Zellgeneration in großer Anzahl erschienen war (56).

#### j) Problemstellung

Bei Versuchen mit menschlichem Knochenmark in vitro wird die Größe der Variationsmöglichkeit, die im Tier-

versuch durch die Unterschiede von Tier zu Tier besteht, verringert. Außerdem können nervale und humorale Einflüsse in Knochenmarkkulturen ausgeschaltet werden.

Nicht alle Erythropoietinpräparate sind für in vitro Versuche geeignet, da durch Verunreinigungen unspezifische Hemmungen im System auftreten können (GOLDWASSER 1966) (38).

In dieser Arbeit soll daher untersucht werden, ob die beiden Erythropoietinpräparate:

1.) "International Reference Preparation of Erythropoietin"

(= Erythropoietin "London")

2.) Schaferythropoietin Step I (CMRL)

(= Erythropoietin "Toronto")

für Versuche mit menschlichen Knochenmarkkulturen anwendbar sind und ob sie die Proliferation der Erythropoese des Menschen in vitro in der oben angeführten Weise verändern können.

## II. Material und Methode

Das zur Untersuchung erforderliche Knochenmarkgewebe wird bei sechs Patienten durch Sternalpunktion gewonnen. Von dem Punktat werden sofort Ausstriche angefertigt und Koagulumkulturen angelegt. Dabei kommt die von BOLL modifizierte Carrel'sche Technik der Gewebezüchtung zur Anwendung (6). Als Nährboden der Kulturen ohne Zusatz dient in der Untersuchungsreihe I (Pat. 1-3) ein Koagulum aus:

50 % autologem nativem Blutplasma

40 % TC Eagle (Fa. Difco, Detroit U.S.A.)

bzw. autologem Serum (Pat. 3)

10 % Corhormon<sup>R</sup>, 3-fach verstärkt (Fa. Homburg)

In der Untersuchungsreihe II (Pat. 4-6) setzt sich der Nährboden der Kulturen ohne Zusatz folgendermaßen zusammen:

40 % autologes natives Blutplasma

20 % autologes Serum

30 % physiol. Kochsalzlösung

10 % Corhormon<sup>R</sup>, 3-fach verstärkt (Fa. Homburg)

Auf diesen Spezialnährboden wird nach dem Koagulieren ein Markbröckel aufgesetzt, mit einem Serumptropfen überschichtet und mit einem Hohlschliffträger bedeckt. Die Kulturen werden mit Paraffin luftdicht verschlossen und

bei 37° C im Brutofen als hängende Tropfen bebrütet.

Von allen sechs Patienten werden parallel Kulturen mit Erythropoietinzusatz angelegt.

In der Untersuchungsreihe I wird mit der "International Reference Preparation of Erythropoietin", hergestellt bei der Division of Biological Standards, National Institute for Medical Research, Mill Hill, London, gearbeitet. Dieses, aus menschlichem Urin gewonnene, Erythropoietinpräparat wird seit 1966 von der WHO als Standardpräparat empfohlen.

Der mit diesem Erythropoietin "London" hergestellte Nährboden hat folgende Zusammensetzung:

50 % autologes Blutplasma

30 % Eagle (Fa. Difco, Detroit U.S.A.)

bzw. autologes Serum (Pat. 3)

10 % Erythropoietinlösung

10 % Corhormon<sup>R</sup>, dreifach verstärkt (Fa. Homburg)

Die Endkonzentration von Erythropoietin beträgt dabei 1 IE/ml in der Kultur.

In der Untersuchungsreihe II wird Schaferythropoietin Step I (CMRL) von Connaught Medical Research Laboratories, Willowdale, Ontario Canada, University of Toronto, zugesetzt. Im Gegensatz zu Erythropoietin "London" ist dieses Erythropoietin "Toronto" käuflich zu erwerben. Es wird häufig im Tierversuch angewendet.

Der mit Erythropoletin "Toronto" hergestellte Nährboden hat folgende Zusammensetzung:

40 % autologes Blutplasma

20 % autologes Serum

30 % Erythropoletinlösung

10 % Corhormon<sup>R</sup>, dreifach verstärkt (Fa. Homburg)

Dabei beträgt die Endkonzentration von Erythropoletin 1,8 IE/ml im Koagulum.

Nach 24, 48 und 72 Stunden werden Ausstrichpräparate angefertigt und zusammen mit den Originalausstrichen nach Pappenheim gefärbt.

In jedem Präparat werden ca. 2.000 Zellen ausdifferenziert und gezählt. Zur Differenzierung werden die besonders viel hämatopoetische Zellen enthaltenden Randpartien der Ausstriche bevorzugt. Auch werden alle Mitosen gezählt und ihre Phasen bestimmt. Insgesamt kommen 84.193 Zellen zur Differenzierung.

Bei den Fällen IV und VI wird eine Retikulozytenzählung durchgeführt. Dazu erfolgt die Färbung der Ausstriche nach der von REGENSBURGER (68) beschriebenen Methode. Es werden in jedem Präparat bei 0, 24, 48 und 72 Stunden 500 erythropoetische Vorstufen einschließlich Retikulozyten gezählt. Auf eine Differenzierung der Stadien 0-IV wird verzichtet. Die Retikulozyten des Stadium 0 (reife Erythroblasten mit Substantia granulofilamentosa) werden mitgezählt. Danach wird das Verhältnis der Retikulozyten

zu Erythroblasten bestimmt und auf ‰ umgerechnet.

Alle Auszählungen werden mit einem binokularen Mikroskop bei 1250-facher Vergrößerung durchgeführt.

Die rote Reihe wird differenziert in:

Proerythroblasten (PE), basophile Erythroblasten (bE), polychromatische Erythroblasten (pE), oxyphile Erythroblasten (oE) und reife Erythroblasten (rE).

Die weiße Reihe wird differenziert in:

Myeloblasten (MB), Promyelozyten (PM), neutrophile Myelozyten (MC), eosinophile Myelozyten (eMC), basophile Myelozyten (bMC), Promonozyten (PMo), Metamyelozyten (MM), neutrophile stabkernige Granulozyten (StG), neutrophile segmentkernige (SG), eosinophile segmentkernige (eSG) und basophile segmentkernige Granulozyten, Monozyten (Mo).

Außerdem werden noch große und kleine Retikulumzellen, phagozytierende Retikulumzellen, "Übergangszellen" von Retikulumzellen zu Proerythroblasten, Lymphozyten und Plasmazellen differenziert.

Die Differenzierung der erythropoetischen Vorstufen erfolgt nach den Kriterien von BOLL und MERSCH (9), die Differenzierung der granulopoetischen Zellen nach BOLL (6).

Zusätzlich werden folgende Zellen unterschieden:

Der Promonozyt (PMo) ist ungefähr so groß wie der Promyelozyt. Der Kern kann einseitig eingebuchtet sein,

das Chromatingerüst erscheint locker. Typisch für diese Zelle ist der breite bläulich rauchgraue Plasmasaum mit manchmal zarter Azurgranulation.

Der Monozyt (MÖ), die größte Zelle des peripheren Blutes, fällt durch einen großen gelappten vielgestaltigen Kern mit lockerem grobfädigem Chromatingerüst und durch rauchgraues Zytoplasma auf.

Die große Retikulumzelle - auch Sinusoidzelle genannt - besitzt einen großen ovalen blaßroten Kern mit sehr lockerer Chromatinstruktur und häufig mehreren gut erkennbaren Nukleolen. Die Zytoplasmagrenzen sind oft sehr schwer zu erkennen, das Zytoplasma ist kaum anfärbt.

Die "Übergangszelle" steht nach BOLL (8) morphologisch zwischen der großen Retikulumzelle und dem Proerythroblasten. Die Kernstruktur mit Nukleolen ist die der großen Retikulumzelle. Das Zytoplasma ist schon schwach basophil, kompakter und meistens, wenn auch häufig mit Ausläufern, begrenzt. Diese Zelle könnte eventuell als "determinierte Stammzelle" der Erythropoese angesehen werden, da sie bei jeder Form starker Stimulierung der Erythropoese gehäuft vorkommt.

Die kleine Retikulumzelle hat einen runden kleinen Kern mit netziger Struktur, welcher sich intensiver anfärbt als der der großen Retikulumzelle. Der Plasmasaum ist schmal. Die Abgrenzung zu kleinen Lymphozyten ist nicht immer möglich. Phagozytose wird nicht beobachtet.

Die phagozytierende Retikulumzelle ist eine große Retikulumzelle mit intraplasmatischen Einlagerungen im weiten Zytoplasma.

Der Lymphozyt hat einen runden Kern von dunkelrot-violetter Farbe und scholliger Struktur. Das Zytoplasma ist nur gering vorhanden, hellblau und enthält teilweise leuchtend rote Granula. Wenn der Zytoplasmasaum sehr schmal ist, wie beim kleinen Lymphozyten, ist die Unterscheidung von der kleinen Retikulumzelle nicht sicher möglich.

Die Plasmazelle hat länglich ovale Form mit exzentrisch gelegenen relativ kleinem rundem Kern. Das Chromatingerüst ist grobschollig und meist in Radspeichenstruktur angeordnet. Das Zytoplasma ist homogen kornblumenblau und enthält meist eine Vakuole. Das Kern-Plasma-Verhältnis ist zugunsten des Zytoplasmas verschoben (1:4).

Neben dem Ausdifferenzieren der Zellen werden auch die Mitosen gezählt.

#### Teilungsfähige Zellen der roten Reihe:

Alle Erythroblasten außer den reifen Erythroblasten.

#### Teilungsfähige Zellen der weißen Reihe:

Myeloblast

Promyelozyt

Myelozyt

Metamyelozyt

Promonozyt

Die Mitosen der Myelozyten und Metamyelozyten lassen sich nur in der Prophase unterscheiden.

Die Mitosen werden nach BOLL (5) in folgende sechs Phasen eingeteilt:

1.) Prophase (P):

Die Kernmembran ist aufgelöst. Die Nukleolen sind verschwunden. Die Chromosomen sind zwar schon zu erkennen, aber noch im festen Spirem angeordnet.

2.) Frühe Metaphase (fM):

In lockerem Spirem breiten sich die Chromosomen über die Stelle des früheren Kerns aus.

3.) Späte Metaphase (sM):

Die Chromosomen sind verdoppelt und ordnen sich sternförmig zum Monaster bzw. zur Äquatorialplatte an.

4.) Anaphase (A):

Die Chromosomenpaare sind getrennt und rücken auseinander. Dadurch entsteht in der Zelle das Bild des Diasters oder Dispirems.

5.) Telophase (T):

Das Zytoplasma ist eingeschnürt.

6.) Rekonstruktionsphase (R):

Die Durchschnürung der Zelle ist vollzogen. Die Tochterzellen enthalten je ein festes Spirem. Kernmembran und Nukleolen sind noch nicht wieder ausgebildet. Eine Plasmabrücke zwischen den Zellen kann noch bestehen.

Aus den Zählergebnissen werden Reifungskurven und karyologische Kurven aufgestellt, Mitose- und G/E-Indices bestimmt.

Die Reifungskurven zeigen die prozentuale Verteilung der Zellarten während der drei Kulturtage, getrennt nach Granulo- und Erythropoese auf. Dabei wird auf der Abszisse der prozentuale Anteil der einzelnen Reifungsstufen der Erythropoese bzw. Granulopoese fortlaufend aufgetragen. Auf der Ordinate wird die Zeit in Stunden angegeben (h).

In den Reifungskurven bedeutet (Abb. 2 - 9):

————— Kontrollkulturen ohne Zusatz

----- Kulturen mit Erythropoietinzusatz

Karyologische Kurven zeigen in graphischer Darstellung die prozentuale Verteilung der Mitosephasen (Abb. 10).

Der Mitoseindex drückt das Verhältnis von gefundenen Mitosen zu gezählten teilungsfähigen Zellen aus (6) und wird in ‰ angegeben (Tab. V u. VI).

Der G/E-Index, das Verhältnis von Granuloblasten und Granulozyten zu allen Erythroblasten, sagt etwas über das relative Verhalten von Granulopoese zu Erythropoese aus (Tab. IX u. X).

Um zu prüfen, ob die in den Reifungskurven sichtbar gewordenen Unterschiede zwischen Kontroll- und Zusatzkulturen zufällig oder signifikant sind, müssen sta-

statische Berechnungen angestellt werden (Tabelle I - IV). Mit Hilfe des  $\chi^2$ -Tests nach Helmert Pearson (36) werden jeweils die zwei Kulturreihen eines Patienten verglichen. Folgende Bezeichnungen werden angewandt:

A = Zellzahl der zu vergleichenden Zellgruppe der Kontrollkultur

B = Zellzahl der zu vergleichenden Zellgruppe der Kultur mit ESF-Zusatz

$E_A$  = Erwartungswert in der Kontrollkultur

$E_B$  = Erwartungswert in der Zusatzkultur

$$E_A = (A + B) \cdot \frac{\sum_{i=1}^x A_i}{\sum_{i=1}^x A_i + B_i} \quad E_B = (A + B) \cdot \frac{\sum_{i=1}^x B_i}{\sum_{i=1}^x A_i + B_i}$$

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^x \frac{(A_i - E_{A_i})^2}{E_{A_i}} + \sum_{i=1}^x \frac{(B_i - E_{B_i})^2}{E_{B_i}}$$

Zu den errechneten  $\chi^2$ -Werten werden, entsprechend der Freiheitsgrade, die zugehörigen P-Werte aus den graphischen Tafeln von Pätou (4) entnommen. Dabei ist P die Wahrscheinlichkeit dafür, daß beide Meßreihen derselben Grundgesamtheit entstammen. Für die Beurteilung von P gilt:

$P > 0,05$ : Die Differenz zwischen beiden Reihen ist zufällig.

$0,05 > P > 0,01$ : Die Zugehörigkeit beider Meßreihen zu derselben Grundgesamtheit ist zweifelhaft.

$0,01 > P > 0,0027$ : Die Differenz zwischen beiden Reihen ist statistisch einigermäßen gesichert.

$P < 0,0027$ : Die Differenz zwischen beiden Meßreihen ist statistisch gut gesichert.

Auch die Unterschiede der Mitosenhäufigkeit der Erythropoese werden mit der  $\chi^2$ -Methode geprüft (Tabelle VII).

Folgende Patienten werden zur Untersuchung ausgewählt:

Untersuchungsreihe I (Pat. 1-3)

Patienten ohne hämatologische Erkrankungen, bei denen die Sternalpunktion zur Klärung des Krankheitsbildes vorgenommen und bei denen ein annähernd normales Knochenmark gefunden wird. Es besteht nur bei allen eine leichte Vermehrung der Erythropoese (G/E-Index 2,2 - 2,5).

Fall I: Patientin H.H. 78 Jahre alt

Klinische Diagnose: Cholelithiasis mit Verschlussikterus, Splenomegalie, Hypertonie bei chronischer Pyelonephritis, Herzinsuffizienz.

Blutbild: 13.1.1970

|                 |        |                      |            |                       |
|-----------------|--------|----------------------|------------|-----------------------|
| Erythrozyten    | 3,92   | Mill/mm <sup>3</sup> | Leukozyten | 5200 /mm <sup>3</sup> |
| Hb              | 11,0   | g%                   | Eos        | 2 %                   |
| Hb <sub>E</sub> | 28,0   | pg                   | Stab       | 2 %                   |
| Thrombozyten    | 124000 | / mm <sup>3</sup>    | Segm       | 78 %                  |
| Retikulozyten   | 9      | %                    | Lymph      | 18 %                  |

BSR 84/116, Harnstoff 54 mg%, Kreatinin 1,2 mg%, Bilirubin dir. 3,5 mg%, alkal. Phosphatase 14 E, Bence - Jones - Eiweißkörper im Urin: negativ.

Milzpunktion (5.1.1970): Vermehrung großer und mittel-  
großer Retikulumzellen.

Medikamentöse Therapie vor der Sternalpunktion:

Lanicor<sup>R</sup> 2 x 1 Tabl., Atropin 3 x 1/4 mg, Valium<sup>R</sup>  
1 x 5 mg, Hepsan<sup>R</sup> 3 x 2 Kapseln.

Die Sternalpunktion wird zur Klärung der Splenomegalie  
vorgenommen.

Knochenmarkbefund (5.1.1970): Mäßige Plasmazellvermehrung.  
Reife Erythroblasten und  
stabkernige neutrophile Gra-  
nulozyten etwas vermehrt.

Fall II: Patient O.S. 77 Jahre alt.

Klinische Diagnose: Paroxysmale Herzrhythmusstörungen mit  
ungeklärter Senkungsbeschleunigung.  
Eine Myocarditis kann nicht bewiesen  
werden.

Blutbild: 8.1.1970

|                 |                           |                                |                      |
|-----------------|---------------------------|--------------------------------|----------------------|
| Erythrozyten    | 4,15 Mill/mm <sup>3</sup> | Leukozyten                     | 7000/mm <sup>3</sup> |
| Hb              | 12,4 g%                   | Myelozyten                     | 4 %                  |
| Hb <sub>E</sub> | 29,8 pg                   | Metamyeloz.                    | 3 %                  |
|                 |                           | Stab                           | 4 %                  |
|                 |                           | Segm                           | 71 %                 |
|                 |                           | Lymph                          | 14 %                 |
|                 |                           | Atyp. monozy-<br>täre Z. (AMZ) | 4 %                  |

BSR 83/100, Latex-Test negativ, AS-Titer: 166 ASE, Gesamteiweiß 6,58 g, SGOT 22, SGPT 20, Bence - Jones-Eiweißkörper im Urin: negativ.

Medikamentöse Therapie vor der Sternalpunktion:

Digimerck<sup>R</sup> 2 x 1 Tabl., Atropin 3 x 1/2 mg, Comblizym compositum<sup>R</sup> 3 x 2 Drag.

Die Sternalpunktion wird am 5.1.1970 zur Klärung der hohen BSR vorgenommen.

Knochenmarkbefund: Bis auf geringe Vermehrung der Plasmazellen und leichte Linksverschiebung in der erythropoetischen Reihe normales Knochenmark.

Fall III: Patient P.H. 60 Jahre alt

Klinische Diagnose: Pleuritis rheumatica. Zustand nach Lungensteckschuß und Influenza.  
Chronische Tonsillitis, Sinusitis maxillaris und Sinusitis frontalis.

Blutbild: 19.1.1970

|                 |                           |            |                       |
|-----------------|---------------------------|------------|-----------------------|
| Erythrozyten    | 4,02 Mill/mm <sup>3</sup> | Leukozyten | 13500/mm <sup>3</sup> |
| Hb              | 12,0 g%                   | Eos        | 3 %                   |
| Hb <sub>E</sub> | 29,8 pg                   | Segm       | 79 %                  |
| Hämatokrit      | 40 %                      | Lymph      | 9 %                   |
|                 |                           | Mono       | 1 %                   |
|                 |                           | AMZ        | 8 %                   |

BSR 120/135, Latex-Test positiv, KBR auf Grippeviren: Eigenhemmung, AS-Titer 1250 ASE, C-reaktives Protein positiv.

Medikamentöse Therapie vor der Sternalpunktion:

Valium<sup>R</sup> 2 x 10 mg, Lanicor<sup>R</sup> 3 x 1 Tabl., Perphyllon<sup>R</sup> 2 x 1 Supp., Sol.kal.jodat. 20 % 3 x 2 g, Moronal<sup>R</sup> 5 x 2 Drag., Ultracorten<sup>R</sup> 50 mg, Penicillin-G 5 x 10 Mega, Pyramidon 0,2 g wird bis 4 Tage vor der Punktion 6 x 1 Tabl. verabreicht.

Knochenmarkbefund (20.1.1970): Normales Knochenmark.

#### Untersuchungsreihe II (Pat. 4-6)

Hierzu werden Patienten mit nephrogenen Anämien und den entsprechenden Veränderungen im Knochenmark ausgewählt, in der Annahme, daß ihre körpereigene Erythropoietinproduktion erniedrigt sei. Die Erythropoese ist trotzdem relativ vermehrt (G/E-Index 1,7 - 2,7).

Fall IV: Patientin E.P. 63 Jahre alt

Klinische Diagnose: Anämie bei chronischer Pyelonephritis. Chronische Hepatitis mit Cholelithiasis.

Blutbild: 5.7.1971

|                 |                        |                      |             |                      |
|-----------------|------------------------|----------------------|-------------|----------------------|
| Erythrozyten    | 2,66                   | Mill/mm <sup>3</sup> | Leukozyten  | 6100/mm <sup>3</sup> |
| Hb              | 9,1                    | g%                   | Eos         | 2 %                  |
| Hb <sub>E</sub> | 34,4                   | pg                   | Stab        | 5 %                  |
| Retikulozyten   | 10                     | %o                   | Segm        | 78 %                 |
| Thrombozyten    | 169000/mm <sup>3</sup> |                      | Lymph       | 13 %                 |
| Quickwert       | 74                     | %                    | Mono        | 2 %                  |
|                 |                        |                      | Anisozytose |                      |

BSR 95/119, Eisenspiegel  $24 \mu\text{g}\%$ , RR 110/70 mmHg, Elektrophorese:  $\gamma$ -Globulin vermehrt (22,1 %).

Bei der Aufnahme (15.6.1971): SGOT 76, SGPT 29, Harnstoff 80 mg%, Kreatinin 4,1 mg%.

Bei Kontrolle zur Zeit der Punktion (6.7.1971): SGOT 29, SGPT 13, Harnstoff 62 mg %, Kreatinin 2,9 mg%.

Urin: massenhaft Leukozyten. Laparaskopie: chronische Hepatitis.

Leberpunktion: Diffuse Verfettung, geringe entzündliche Infiltration.

Isotopennephrogramm: re. unauffällig, li. Isosthenuriezeichen.

Medikamentöse Therapie vor der Sternalpunktion:

Kallnor-Brause-Tabletten<sup>R</sup> 2 x 1, Atropin 3 x 1/4 mg, DHE retard<sup>R</sup> 2 x 1 Tabl., Lanicor<sup>R</sup> 3 x 1 Tabl., Vallium 10<sup>R</sup> und Psyquil<sup>R</sup> bei Bedarf. Paraxin<sup>R</sup> 1 g/die bis drei Tage vor der Punktion (elf Tage lang), Furadantin retard<sup>R</sup> 1 x 1 Kapsel.

Die Sternalpunktion wird zur Anämiediagnostik durchgeführt.

Knochenmarkbefund (6.7.1971): Erythropoese normal, wenig links verschoben. Megaloblasten kommen vor. Eosinophile, Promonozyten und Monozyten sind vermehrt.

Fall V: Patient E.S. 57 Jahre alt

Klinische Diagnose: Bilaterale Lungen-Tbc. Anämie bei  
chronischer Niereninsuffizienz.  
Trichomoniasis.

Blutbild: 29.7.1971

|                 |        |                      |            |                      |
|-----------------|--------|----------------------|------------|----------------------|
| Erythrozyten    | 2,91   | Mill/mm <sup>3</sup> | Leukozyten | 6200/mm <sup>3</sup> |
| Hb              | 9,1    | g%                   | Bas        | 2 %                  |
| Hb <sub>E</sub> | 31,5   | pg                   | Eos        | 6 %                  |
| Hämatokrit      | 37     | %                    | Stab       | 4 %                  |
| Thrombozyten    | 184000 | /mm <sup>3</sup>     | Segm       | 63 %                 |
| Retikulozyten   | 14     | %o                   | Lymph      | 24 %                 |
|                 |        |                      | Mono       | 1 %                  |

Aniso- und Polkilozytose, Polychromasie

BSR 45/78, Harnstoff 71 mg%, Kreatinin 4,0 mg%, Eisen-  
spiegel 92 µg%. In Urin und Sputum keine Tuberkelbazillen  
nachweisbar.

Medikamentöse Therapie vor der Sternalpunktion:

Neoteben<sup>R</sup> 2 x 0,2 mg, Vallum<sup>R</sup> 10 mg, Sol.kal.jodat. 20 %  
3 g, Lanicor<sup>R</sup> 3 x 1 Tabl., Lasix<sup>R</sup> 1 Tabl. jeden zweiten  
Tag, Rifampicin<sup>R</sup> 750 mg/die.

Die Sternalpunktion wird zur Klärung der Anämie vorgenom-  
men.

Knochenmarkbefund (26.7.1971): Erythropoese gestelgert

und etwas nach links ver-  
schoben. Megaloblasten kom-  
men vor. Eosinophile, Pro-  
monozyten und Monozyten  
scheinen vermehrt.

Fall VI: Patientin A.Z. 65 Jahre alt

Klinische Diagnose: Rechts latero-basale Pneumonie.

Diarrhoen und Anämie bei chronischer  
Niereninsuffizienz. Hypertonus.

Blutbild: 30.7.1971

|                 |                           |            |                      |
|-----------------|---------------------------|------------|----------------------|
| Erythrozyten    | 3,34 Mill/mm <sup>3</sup> | Leukozyten | 5900/mm <sup>3</sup> |
| Hb              | 9,7 g%                    | Eos        | 6 %                  |
| Hb <sub>E</sub> | 29,0 pg                   | Stab       | 8 %                  |
| Hämatokrit      | 31 %                      | Segm       | 53 %                 |
| Thrombozyten    | 155000/mm <sup>3</sup>    | Lymph      | 25 %                 |
| Retikulozyten   | 64 ‰                      | Mono       | 8 %                  |
| Anisozytose     |                           |            |                      |

Zur Zeit der Aufnahme (25.6.1971):

BSR 125/158, Harnstoff 340 mg%, Kreatinin 9,3 mg%, Blutzucker 152 mg%, Leukozyten 37100/mm<sup>3</sup>.

Zur Zeit der Punktion (28.7.1971):

BSR 67/110, RR 120/80, Eisenspiegel 61 µ g%, Harnstoff 60 mg%, Kreatinin 4,3 mg%.

Medikamentöse Therapie vor der Sternalpunktion:

Doriden<sup>R</sup> 1 Tabl., Valium<sup>R</sup> 5 mg, Lanicor<sup>R</sup> 1 Tabl., Modenol<sup>R</sup> 2 x 1 Drag., Binotal<sup>R</sup> 3 g (bis 8 Tage vor der Punktion), Furadantin<sup>R</sup> 100 mg (Beginn 8 Tage vor Punktion). Gelegentlich Kalinor-Brause-Tabletten<sup>R</sup>.

Die Sternalpunktion wird zur Anämiediagnostik vorgenommen.

Knochenmarkbefund (28.7.1971): Erythropoese gesteigert.

Megaloblasten. Eosinophile,  
Promonozyten und Monozyten  
vermehrt.

### III. Ergebnisse

#### A) Differentialzählung der Knochenmarkzellen (Reifungskurven)

Versuchsreihe I unter Zusatz von Erythropoietin "London" an annähernd normalem Knochenmark.

##### Fall I (Abb. 2)

Die im Originalausstrich vermehrten reifen Erythroblasten nehmen in den Kontrollkulturen kontinuierlich bis 72 Std zu, während die basophilen und polychromatischen Erythroblasten entsprechend abnehmen. Die oxyphilen Erythroblasten bleiben konstant.

Unter Zusatz von ESF "London" nehmen bei 24 Std die oxyphilen Erythroblasten vor allem auf Kosten der reifen Erythroblasten signifikant zu. Bei 48 Std dagegen ist die starke Vermehrung der reifen Erythroblasten unter Abnahme der polychromatischen Erythroblasten, welche bis 72 Std fast konstant bleibt, auffallend und signifikant. Nach 72 Std gleichen sich die Werte an.

Während die Granulopoese in der Kontrollkultur bei 24 Std die übliche Zunahme der teilungsfähigen Zellen und bei 48 und 72 Std deren fortschreitende Verminderung zugunsten der segmentkernigen Neutrophilen zeigt, fällt in den Kulturen mit Erythropoietinzusatz schon bei 24 Std eine starke Zunahme der Segmentkernigen auf. Diese Erscheinung wird annähernd konstant bis 72 Std beobachtet.

Fall II (Abb. 3)

Im Originalausstrich fällt in der Erythropoese eine Vermehrung der Proerythroblasten und basophilen Erythroblasten auf, während oxyphile und reife Erythroblasten ganz fehlen.

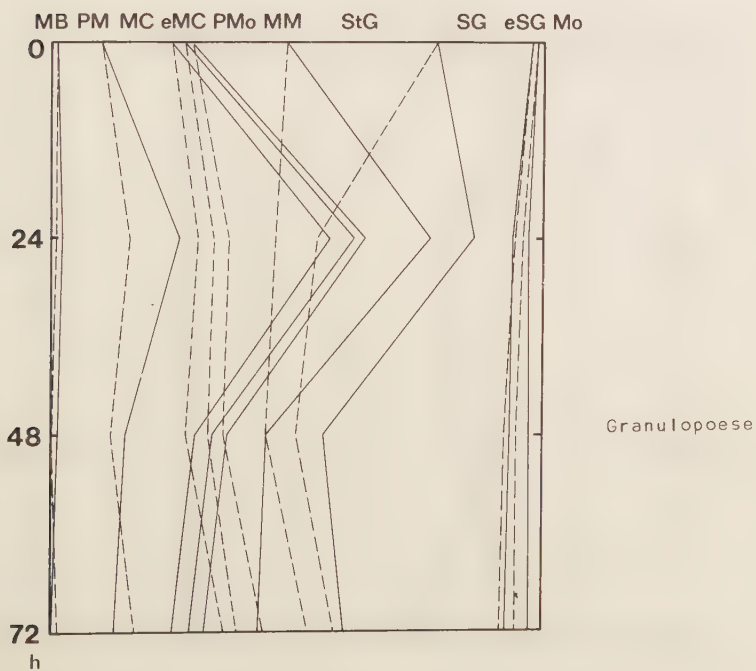
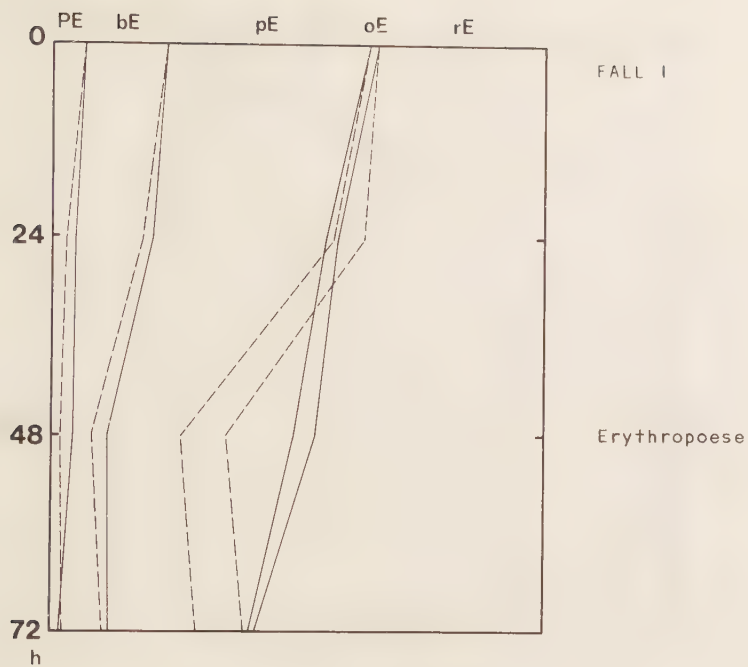
In den Kontrollkulturen beobachtet man eine fast stetige Zunahme nicht nur der reifen, sondern auch der oxyphilen Erythroblasten.

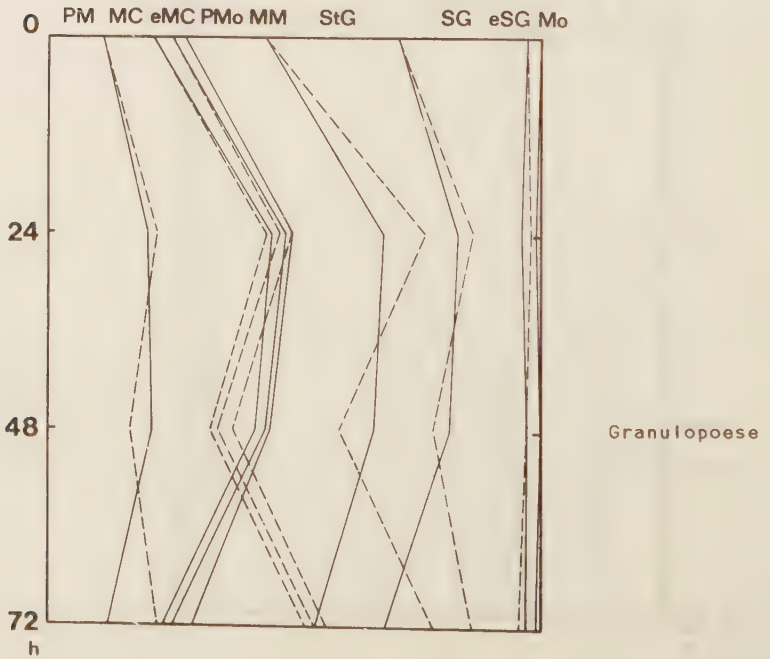
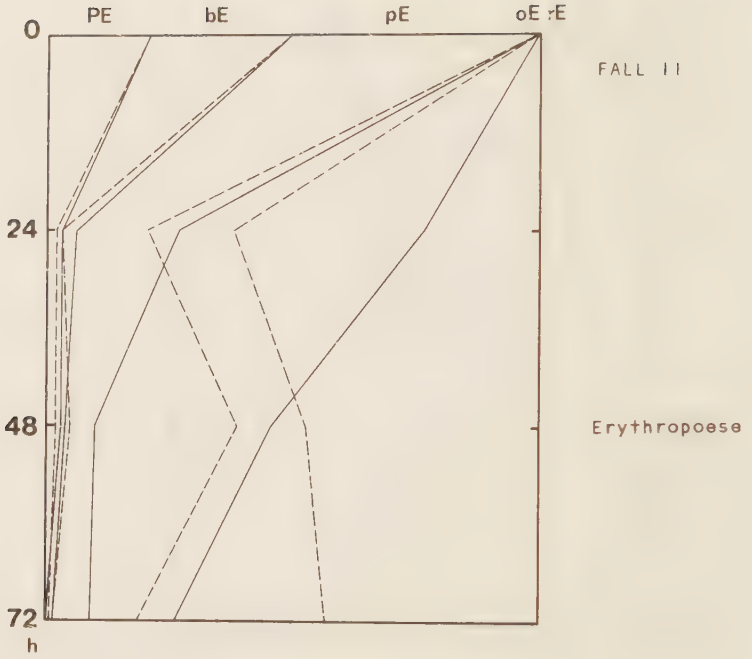
In den Erythropletinkulturen nehmen die reifen Erythroblasten wesentlich schneller zu, was einen signifikanten Unterschied gegenüber den Kontrollen bedingt. Bei 48 und 72 Std sinken die Werte der oxyphilen und reifen Erythroblasten unter die der Kontrollen ab. Die in der Granulopoese in der Regel beobachtete Zunahme teilungsfähiger Zellen bei 24 Std wird in den Kontrollkulturen festgestellt und in den Zusatzkulturen noch übertroffen. Bei 48 Std werden unter ESF "London" die Reifungskurven etwas linksverschoben, bei 72 Std nachweislich rechtsverschoben.

Fall III (Abb. 4)

Die Erythropoese zeigt in den Kontrollkulturen eine Zunahme der reifen Zellformen bis 72 Std, wobei die größte Vermehrung der reifen Erythroblasten bei 48 Std vorliegt. Die Kulturen mit ESF "London"-Zusatz zeigen ebenfalls eine kontinuierliche Zunahme reifer Zellen, welche wie im 2. Fall schon bei 24 Std signifikant auftritt und bei 48 und 72 Std hinter den Kontrollen zurückbleibt.

In der Granulopoese fällt bei 24 Std in den Kontrollkulturen neben der Zunahme teilungsfähiger Zellen auch die der Segmentkernigen auf. Dabei nehmen die stabkernigen Neutrophilen relativ stark ab. In der Folge kommt es zur üblichen Vermehrung ausgereifter Zellen. Unter ESF-Zusatz erscheinen die Reifungskurven bei 24 Std etwas links-, bei 72 Std rechtsverschoben.





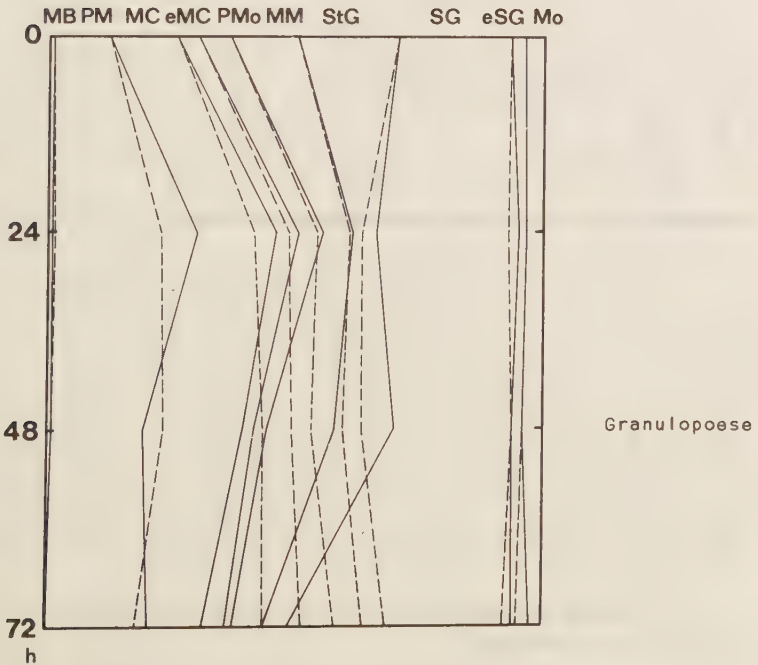
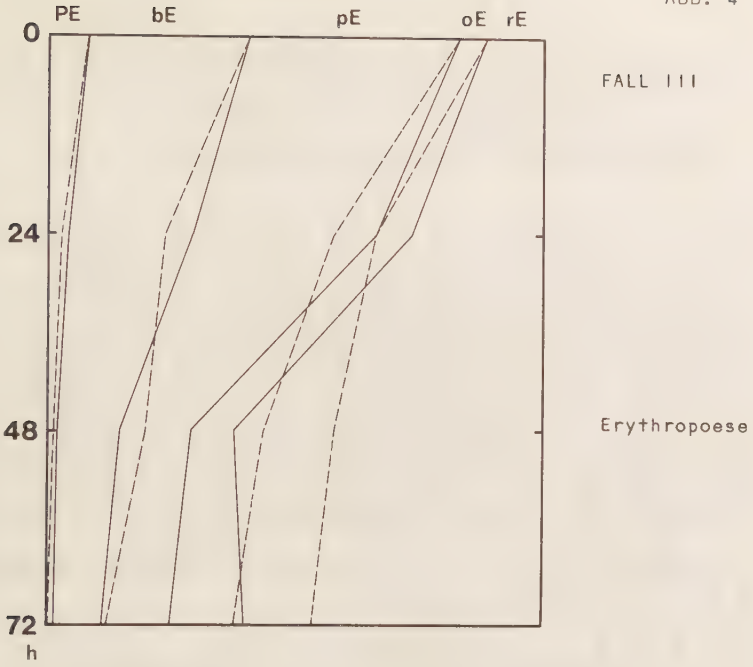


Tabelle 1: Werte zur Signifikanzberechnung bei Fall 1

Erythropoese

1 E/ml Erythropoietin "London" nach 24 Std:

|                                                 | A   | B   | $E_A$  | $E_B$  | $\frac{(A - E_A)^2}{E_A}$ | $\frac{(B - E_B)^2}{E_B}$ |
|-------------------------------------------------|-----|-----|--------|--------|---------------------------|---------------------------|
| PE                                              | 37  | 20  | 34,09  | 22,91  | 0,25                      | 0,37                      |
| bE                                              | 125 | 78  | 121,41 | 81,59  | 0,11                      | 0,16                      |
| pE                                              | 284 | 213 | 297,24 | 199,76 | 0,59                      | 0,88                      |
| oE                                              | 18  | 31  | 29,31  | 19,69  | 4,36                      | 6,49                      |
| rE                                              | 344 | 201 | 325,95 | 219,05 | 0,99                      | 1,49                      |
| $\Sigma$                                        | 808 | 543 |        |        | 6,30                      | 9,39                      |
| $\chi^2_4 = 6,30 + 9,39 = 15,69$ , $P = 0,0035$ |     |     |        |        |                           |                           |

1 E/ml ESF "London" nach 48 Std:

|                                                     |     |     |        |        |       |       |
|-----------------------------------------------------|-----|-----|--------|--------|-------|-------|
| PE                                                  | 26  | 10  | 18,22  | 17,78  | 3,32  | 3,41  |
| bE                                                  | 44  | 37  | 40,99  | 40,01  | 0,22  | 0,23  |
| pE                                                  | 237 | 113 | 177,11 | 172,89 | 20,25 | 20,74 |
| oE                                                  | 25  | 56  | 40,99  | 40,01  | 6,24  | 6,39  |
| rE                                                  | 297 | 398 | 351,69 | 343,31 | 8,51  | 8,71  |
| $\Sigma$                                            | 629 | 614 |        |        | 38,54 | 39,48 |
| $\chi^2_4 = 38,54 + 39,48 = 78,02$ , $P < 10^{-10}$ |     |     |        |        |       |       |

1 E/ml ESF "London" nach 72 Std:

|          |     |     |        |        |       |       |
|----------|-----|-----|--------|--------|-------|-------|
| PE       | 9   | 15  | 11,40  | 12,60  | 0,51  | 0,46  |
| bE       | 71  | 65  | 64,62  | 71,38  | 0,63  | 0,57  |
| pE       | 202 | 149 | 166,78 | 184,22 | 7,44  | 6,73  |
| oE       | 8   | 74  | 38,96  | 43,04  | 24,60 | 22,28 |
| rE       | 418 | 479 | 426,26 | 470,77 | 0,16  | 0,14  |
| $\Sigma$ | 708 | 782 |        |        | 33,34 | 30,18 |

$$\chi^2_4 = 33,34 + 30,18 = 63,52$$
 ,  $P < 10^{-10}$

Die Differenz beider Reihen ist zu allen Prüfzeiten statistisch gesichert.

Tabelle II a: Werte zur Signifikanzberechnung bei Fall I

Granulopoese

1 E/ml ESF "London" nach 24 Std:

|          | A   | B    | $E_A$  | $E_B$  | $\frac{(A - E_A)^2}{E_A}$ | $\frac{(B - E_B)^2}{E_B}$ |
|----------|-----|------|--------|--------|---------------------------|---------------------------|
| MB       | 17  | 13   | 12,85  | 17,15  | 1,34                      | 1,00                      |
| PM       | 215 | 179  | 168,80 | 225,20 | 12,64                     | 9,48                      |
| MC       | 275 | 166  | 188,94 | 252,06 | 39,20                     | 29,38                     |
| eMC      | 45  | 33   | 33,42  | 44,58  | 4,01                      | 3,01                      |
| bMC      | 6   | 1    | 3,00   | 4,00   | 3,00                      | 2,25                      |
| PMo      | 13  | 37   | 21,42  | 28,58  | 3,31                      | 2,48                      |
| MM       | 121 | 116  | 101,54 | 135,46 | 3,73                      | 2,80                      |
| StG      | 81  | 101  | 77,98  | 104,02 | 0,12                      | 0,09                      |
| SG       | 75  | 485  | 239,92 | 320,08 | 113,37                    | 84,98                     |
| eSG      | 26  | 15   | 17,57  | 23,43  | 4,05                      | 3,04                      |
| bSG      | 5   | 11   | 6,85   | 9,15   | 0,50                      | 0,38                      |
| Mo       | 22  | 45   | 28,71  | 38,29  | 1,57                      | 1,17                      |
| $\Sigma$ | 901 | 1202 |        |        | 186,84                    | 140,06                    |

$$\chi_{11}^2 = 186,84 + 140,06 = 326,90, \quad P < 10^{-10}$$

Tabelle II b: Werte zur Signifikanzberechnung bei Fall I

Granulipoese

1 E/ml ESF "London" nach 48 Std:

|          | A    | B    | $E_A$  | $E_B$  | $\frac{(A - E_A)^2}{E_A}$ | $\frac{(B - E_B)^2}{E_B}$ |
|----------|------|------|--------|--------|---------------------------|---------------------------|
| MB       | 10   | 3    | 6,39   | 6,61   | 2,03                      | 1,97                      |
| PM       | 156  | 127  | 139,21 | 143,79 | 2,03                      | 1,96                      |
| MC       | 156  | 169  | 159,87 | 165,13 | 0,09                      | 0,09                      |
| eMC      | 33   | 56   | 43,78  | 45,22  | 2,65                      | 2,57                      |
| bMC      | 9    | 8    | 8,36   | 8,64   | 0,05                      | 0,05                      |
| PMo      | 24   | 30   | 26,56  | 27,44  | 0,25                      | 0,24                      |
| MM       | 88   | 100  | 92,48  | 95,52  | 0,22                      | 0,21                      |
| StG      | 126  | 64   | 93,46  | 96,54  | 11,33                     | 10,96                     |
| SG       | 410  | 479  | 437,30 | 451,70 | 1,70                      | 1,65                      |
| eSG      | 41   | 20   | 30,00  | 30,99  | 4,03                      | 3,90                      |
| bSG      | 12   | 9    | 10,33  | 10,67  | 0,27                      | 0,26                      |
| Mo       | 28   | 64   | 45,25  | 46,75  | 6,58                      | 6,37                      |
| $\Sigma$ | 1093 | 1129 |        |        | 31,23                     | 30,23                     |

$$\chi_{11}^2 = 31,23 + 30,23 = 61,46, \quad P < 10^{-8}$$

Tabelle II c: Werte zur Signifikanzberechnung bei Fall I  
Granulopoese

1 E/ml ESF "London" nach 72 Std:

|                                                                   | A    | B   | $E_A$  | $E_B$  | $\frac{(A - E_A)^2}{E_A}$ | $\frac{(B - E_B)^2}{E_B}$ |
|-------------------------------------------------------------------|------|-----|--------|--------|---------------------------|---------------------------|
| MB                                                                | 6    | 12  | 9,97   | 8,03   | 1,58                      | 1,96                      |
| PM                                                                | 137  | 145 | 156,15 | 125,85 | 2,35                      | 2,91                      |
| MC                                                                | 138  | 167 | 168,89 | 136,11 | 5,65                      | 7,00                      |
| eMC                                                               | 38   | 22  | 33,22  | 26,78  | 0,69                      | 0,85                      |
| bMC                                                               | 4    | 1   | 2,77   | 2,23   | 0,55                      | 0,68                      |
| PMo                                                               | 32   | 47  | 43,74  | 35,26  | 3,15                      | 3,91                      |
| MM                                                                | 122  | 85  | 114,62 | 92,38  | 0,47                      | 0,59                      |
| StG                                                               | 200  | 48  | 137,32 | 110,68 | 28,61                     | 35,49                     |
| SG                                                                | 374  | 309 | 378,20 | 304,80 | 0,05                      | 0,06                      |
| eSG                                                               | 49   | 24  | 40,42  | 32,58  | 1,82                      | 2,26                      |
| bSG                                                               | 6    | 10  | 8,86   | 7,14   | 0,92                      | 1,15                      |
| Mo                                                                | 38   | 52  | 49,84  | 40,16  | 2,81                      | 3,49                      |
| $\Sigma$                                                          | 1144 | 922 |        |        | 48,65                     | 60,35                     |
| $\chi_{11}^2 = 48,65 + 60,35 = 109,00 \quad , \quad P < 10^{-10}$ |      |     |        |        |                           |                           |

Die Differenz beider Reihen ist zu allen Prüfzeiten  
statistisch gesichert.

Tabelle III: Ergebnisse der Signifikanzberechnung  
der Fälle II - VI

Erythropoese

| Fall | 24 Std           |                                     | 48 Std           |                                      | 72 Std           |                                      |
|------|------------------|-------------------------------------|------------------|--------------------------------------|------------------|--------------------------------------|
|      | $\chi^2_{10/11}$ | P                                   | $\chi^2_{10/11}$ | P                                    | $\chi^2_{10/11}$ | P                                    |
| II   | 247,12           | $<10^{-10}$ hoch sign.              | 193,03           | $<10^{-10}$ hoch sign.               | 153,17           | $<10^{-10}$ hoch sign.               |
| III  | 11,76            | 0,02 nicht sicher sign.             | 65,98            | $<10^{-10}$ hoch sign.               | 51,03            | $<10^{-9}$ hoch sign.<br>$>10^{-10}$ |
| IV   | 14,80            | 0,005 sign.                         | 38,85            | $10^{-7}$ hoch sign.                 | 10,34            | 0,035 nicht sicher sign.             |
| V    | 34,26            | $<10^{-6}$ hoch sign.<br>$>10^{-7}$ | 68,51            | $<10^{-10}$ hoch sign.               | 10,60            | 0,0008 sign.                         |
| VI   | 8,37             | 0,08 nicht sign.                    | 50,64            | $<10^{-9}$ hoch sign.<br>$>10^{-10}$ | 34,00            | $<10^{-6}$ hoch sign.<br>$>10^{-7}$  |

Tabelle IV: Ergebnisse der Signifikanzberechnung  
der Fälle II - VI

Granulopoese

| Fall | 24 Std     |                                     | 48 Std     |                                     | 72 Std     |                                     |
|------|------------|-------------------------------------|------------|-------------------------------------|------------|-------------------------------------|
|      | $\chi^2_4$ | P                                   | $\chi^2_4$ | P                                   | $\chi^2_4$ | P                                   |
| II   | 44,29      | $<10^{-5}$ hoch sign.<br>$>10^{-6}$ | 46,20      | $<10^{-5}$ hoch sign.<br>$>10^{-6}$ | 209,10     | $<10^{-10}$ hoch sign.              |
| III  | 36,88      | 0,00015 sign.                       | 110,21     | $<10^{-10}$ hoch sign.              | 200,44     | $<10^{-10}$ hoch sign.              |
| IV   | 13,93      | 0,23 nicht sign.                    | 58,37      | $<10^{-7}$ hoch sign.<br>$>10^{-8}$ | 165,26     | $<10^{-10}$ hoch sign.              |
| V    | 141,78     | $<10^{-10}$ hoch sign.              | 60,57      | $10^{-8}$ hoch sign.                | 52,37      | $<10^{-6}$ hoch sign.<br>$>10^{-7}$ |
| VI   | 47,79      | $<10^{-5}$ hoch sign.<br>$>10^{-6}$ | 44,66      | $<10^{-5}$ hoch sign.<br>$>10^{-6}$ | 106,22     | $<10^{-10}$ hoch sign.              |

Versuchsreihe II unter Zusatz von Erythropoietin  
"Toronto" bei nephrogenen Anämien.

Fall IV (Abb. 5)

Die Reifungskurven der Erythropoese zeigen in der Kontrolle eine mit der Zeit fortschreitende starke Zunahme der reifen Erythroblasten bei gleichzeitiger Abnahme der unreifen Zellen.

Diese Tendenz ist mit Erythropoietin "Toronto" wesentlich stärker ausgeprägt, wobei die Differenz besonders nach 48 Std deutlich signifikant ist, während sie bei 24 Std als einigermaßen gesichert und bei 72 Std nicht als signifikant beurteilt werden kann.

In der Granulopoese zeigt die Kontrollkultur die übliche Vermehrung teilungsfähiger Zellen nach 24 Std, allerdings mäßigen Grades. Danach kommt es mit fortschreiten der Kulturdauer zur Vermehrung der Segmentkernigen.

Durch ESF-Zusatz ist die 24-Stundenkultur statistisch nicht signifikant verändert. Nach 48 Std haben die teilungsfähigen Zellen stärker als in der Kontrolle abgenommen. Nach 72 Std sind sie wieder relativ auf Kosten der Segmentkernigen vermehrt. In beiden Fällen ist die Differenz statistisch gesichert.

Fall V (Abb. 6)

Unter ESF-Zusatz zeigt sich in der Erythropoese gegenüber dem typischen Kurvenverlauf der Kontrollkultur bei 24

Std diesmal eine signifikante Rechtsverschiebung und nach 48 Std wie im vorangegangenen Fall IV wieder eine signifikante Linksverschiebung.

In der Granulopoese kommt es in der Kontrollkultur nach Zunahme der teilungsfähigen Zellen (mit Ausnahme der Promyelozyten), unter besonders starker Zunahme der Myelozyten bei 24 Std, in den folgenden Kulturtagen zu einer fortschreitenden Vermehrung der segmentkernigen Neutrophilen.

Die Zusatzkulturen zeigen dagegen schon bei 24 Std eine deutliche Zunahme der Segmentkernigen, eine schwächere der Myelozyten und keine Abnahme der Promyelozyten. Bei 48 und 72 Std ist eine signifikante Linksverschiebung der Reifungskurven gegenüber den Kontrollen zu beobachten.

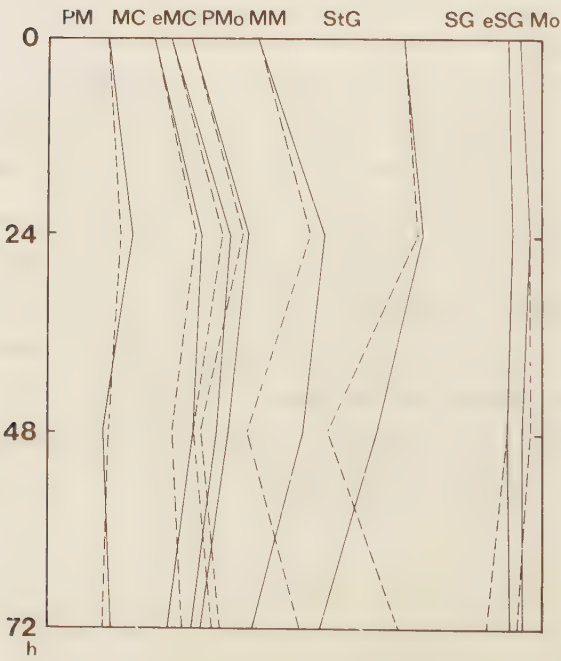
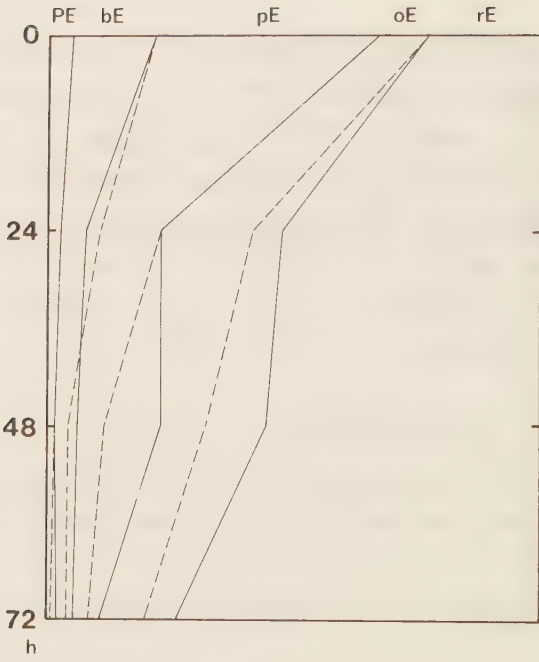
#### Fall VI (Abb. 7)

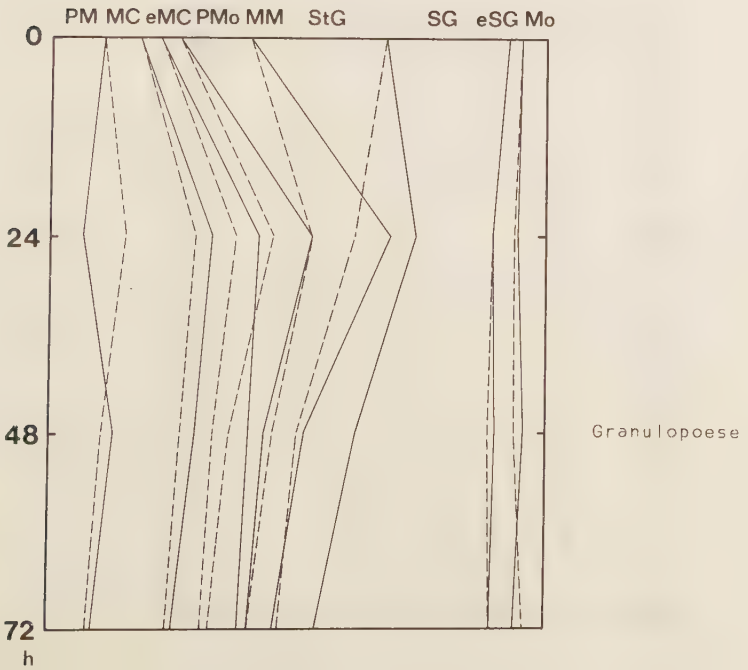
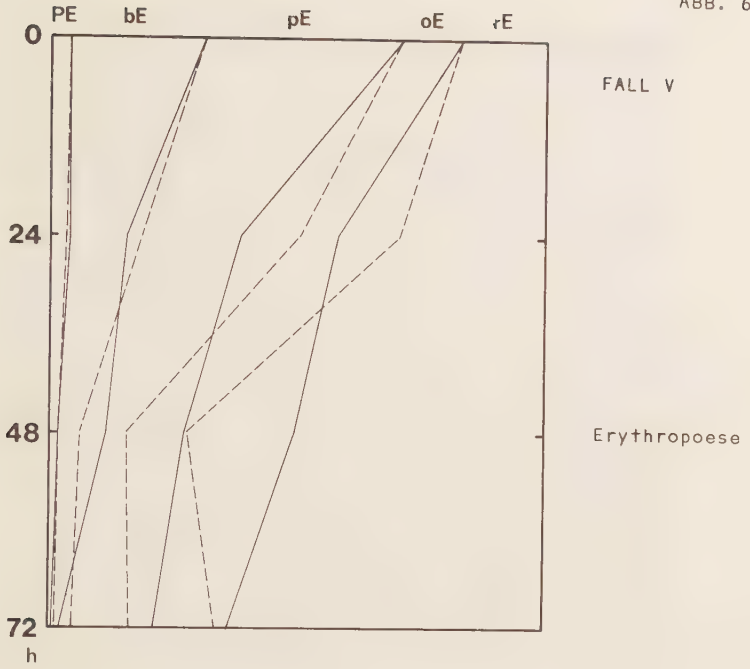
Wie im vorangegangenen Fall zeigt die Erythropoese in den Kontrollkulturen eine mit fortschreitender Kulturdauer bis 48 Std kontinuierliche Zunahme der reifen Erythroblasten und Verminderung der teilungsfähigen Zellen.

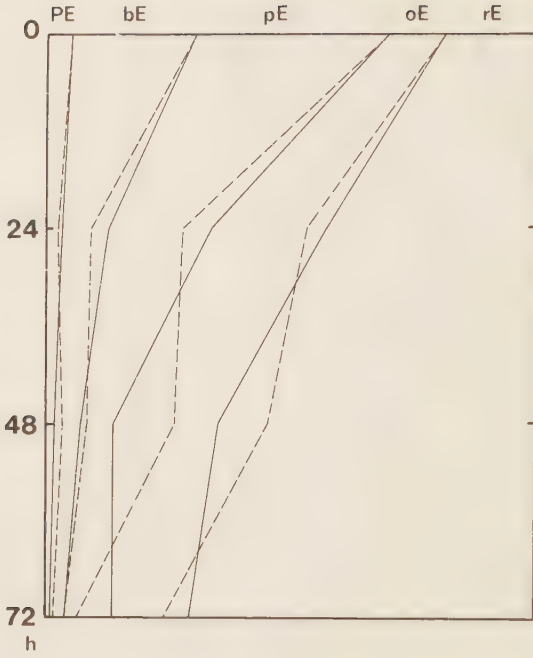
Unter ESF-Zusatz ist die Zunahme der reifen Erythroblasten bei 24 und 72 Std deutlicher, während bei 48 Std die Werte der Kontrolle nicht erreicht werden.

In der Granulopoese zeigt sich bei 24 Std in der Kontrollkultur die übliche Zunahme der teilungsfähigen Zellen (besonders auf Kosten der Stabkernigen), welche sich nach

48 Std bis auf eine weitere Zunahme der Promyelozyten nicht verändert und erst nach 72 Std einer starken Zunahme der Segmentkernigen weicht. Unter Zusatz von ESF erfolgt eine statistisch gesicherte Verschiebung der Reifungskurve bei 24 und 72 Std nach rechts, bei 48 Std nach links.

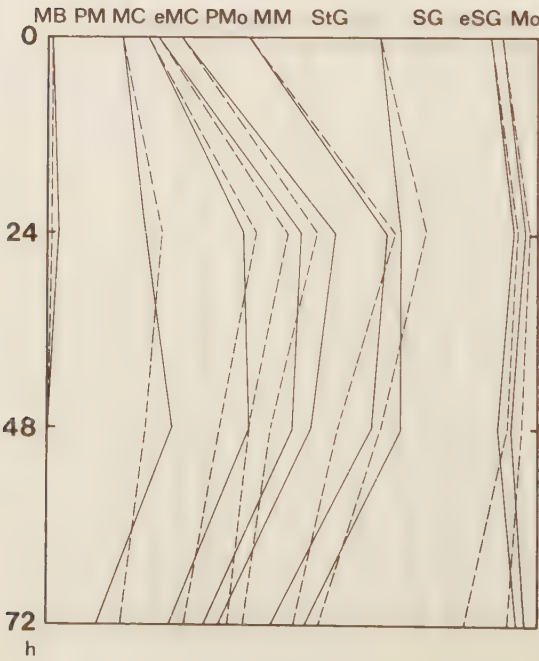






FALL VI

Erythropoese



Granulopoese

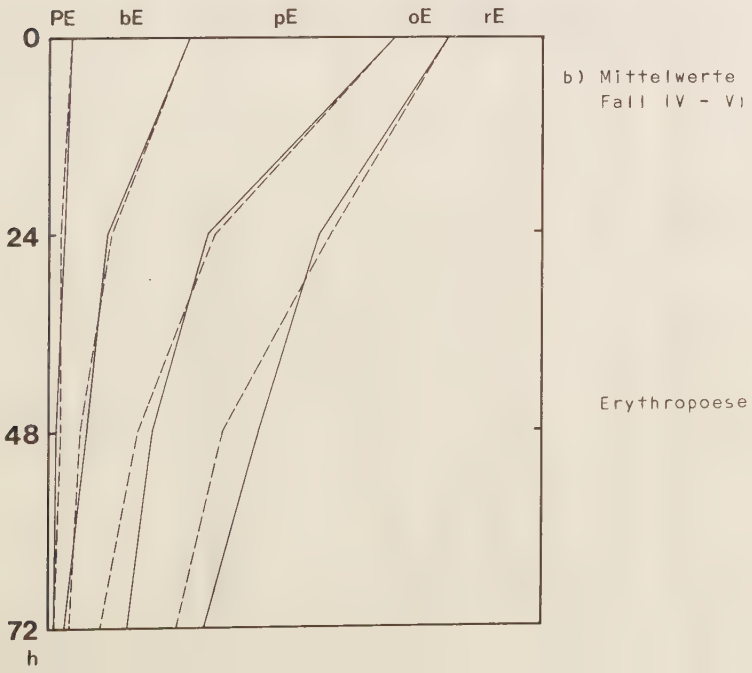
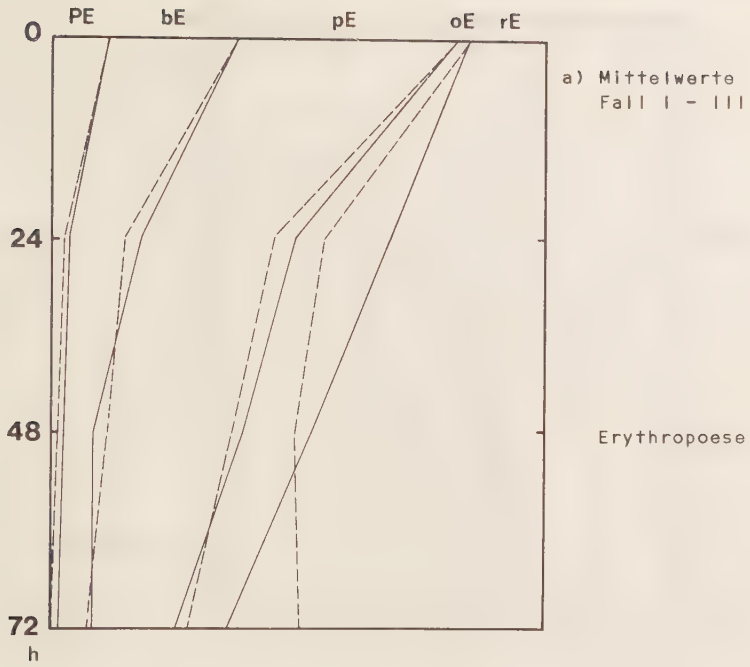
B. Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Reifungskurven

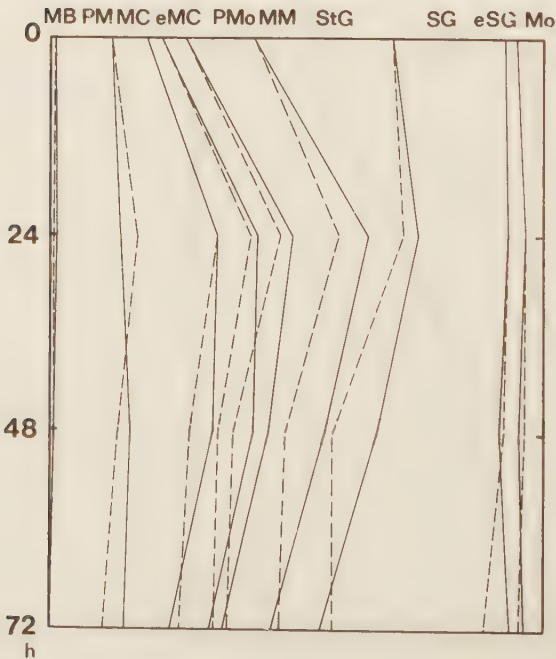
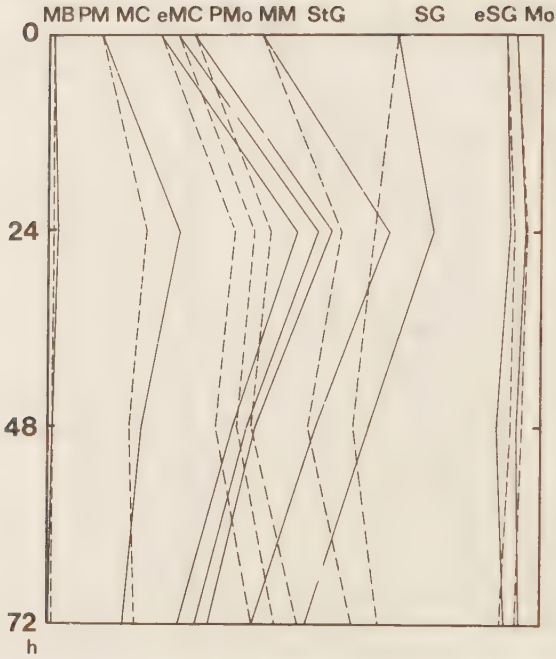
- a) In der Erythropoese der Kontrollkulturen wird in allen sechs Fällen eine fortschreitende Zunahme reifer Zellen unter Abnahme teilungsfähiger Zellen deutlich. Besonders stark ist diese Veränderung nach 48 Std bei Fall II und III.
- Die Mittelwertskurven der drei Kulturen mit annähernd normalem Knochenmark und Zusatz von 1 IE/ml Erythropoietin "London" (Abb. 8 a) zeigen schon nach 24 Std wie Fall II und III eine deutliche Vermehrung der reifen Erythroblasten gegenüber den Kontrollen. In den folgenden Kulturtagen läßt der Effekt deutlich nach. Fall I zeigt dagegen die signifikante Zunahme reifer Erythroblasten erst nach 48 Std. Proerythroblasten und basophile Erythroblasten nehmen unter ESF "London" nicht relativ zu.
- In den Kulturen mit Knochenmark von Patienten mit nephrogenen Anämien erfolgt bei Zusatz von 1,8 IE/ml Erythropoietin "Toronto" bei Fall IV und V nach 24 Std eine leichte Vermehrung der basophilen Erythroblasten.
- Die Mittelwertskurven (Abb. 8 b) zeigen wie in Fall IV und V eine Zunahme der Reifungstendenz unter ESF "Toronto"-Zusatz nach 48 und 72 Std.
- b) In der Granulopoese zeigt sich in allen sechs Fällen in den Kontrollkulturen nach 24 Std eine Vermehrung

der teilungsfähigen Zellen, welche allerdings verschieden stark ausgeprägt ist (am wenigsten in Fall IV). Bei 48 und 72 Std zeigt sich in allen Fällen eine fortschreitende Zunahme der reifen Zellen.

Unter Zusatz von Erythropoietin "London" (Abb. 9 a) zeigt sich in den Mittelwertskurven nach 24 und 48 Std eine signifikante Vermehrung reifer Zellen gegenüber den Kontrollkulturen, während nach 72 Std die reifen Zellen deutlich abnehmen.

In den Kulturen mit Zusatz von ESF "Toronto" (Abb. 9 b) ist dagegen die Vermehrung reifer Zellen nach 48 Std am deutlichsten und signifikant, ihre Verminderung nach 72 Std sehr gering.





C. Mitoseindices (Tabelle V + VI)

Vergleiche der Mitoseindices der Erythropoese in den Kontrollkulturen mit denen der Zusatzkulturen zeigen zu allen Beobachtungszeiten eine Erhöhung der Mitoseindices sowohl unter Erythropoietin "London" als auch unter Erythropoietin "Toronto". Wegen der zu kleinen Mitosezahl ist der Unterschied nicht signifikant.

In der Granulopoese treten unter Erythropoietin sowohl erhöhte als auch erniedrigte Mitoseindexwerte auf, die Mittelwerte bleiben dadurch unverändert.

D. Karyologische Kurven (Abb. 10)

Die Häufigkeit der einzelnen Mitosephasen ändert sich in den Kulturen mit Erythropoietinzusatz nicht gegenüber den Kontrollkulturen. Auf den Mitoseablauf haben danach beide Erythropoietine keinen Einfluß.

E. G/E-Indices (Tabelle IX + X)

Unter Einwirkung von ESF "London" kommt es in einem Fall bei 24 Std, in zwei Fällen bei 48 Std und in allen drei Fällen bei 72 Std zu einer leichten Erniedrigung des G/E-Wertes, also einer relativen Vermehrung der Erythropoese auch im Zusammenhang mit der relativen Abnahme der reifen Erythroblasten (Abb. 8 a).

Tabelle V: Mitoseindices der Erythropoese (in ‰)

|                   | 0 h   | 24 h   |                        | 48 h   |                        | 72 h   |                           |
|-------------------|-------|--------|------------------------|--------|------------------------|--------|---------------------------|
|                   | Orig. | Kontr. | 1 E/ml<br>ESF "London" | Kontr. | 1 E/ml<br>ESF "London" | Kontr. | 1 E/ml<br>ESF<br>"London" |
| Fall I            | 13,2  | 9,1    | 31,0                   | 8,7    | 21,6                   | 7,3    | 15,8                      |
| Fall II           | 8,2   | 9,8    | 14,2                   | 7,7    | 10,1                   | 3,3    | 10,3                      |
| Fall III          | 22,5  | 12,1   | 20,0                   | 15,2   | 20,3                   | 4,2    | 12,4                      |
| arithm.<br>Mittel | 14,6  | 10,3   | 21,7                   | 10,5   | 17,3                   | 4,7    | 12,8                      |
|                   | Orig. | Kontr. | 1,8 E/ml<br>"Toronto"  | Kontr. | 1,8 E/ml<br>"Toronto"  | Kontr. | 1,8 E/ml<br>"Toronto"     |
| Fall V            | 19,4  | 21,3   | 29,4                   | 15,1   | 37,6                   | 7,0    | 12,8                      |
| Fall VI           | 29,3  | 14,0   | 17,4                   | 12,3   | 21,6                   | 3,7    | 11,5                      |
| Fall IV           | 34,1  | 17,9   | 22,6                   | 7,5    | 19,1                   | 0      | 22,1                      |
| arithm.<br>Mittel | 27,6  | 17,7   | 23,1                   | 11,6   | 26,1                   | 5,4    | 15,5                      |

Tabelle VI: Mitoseindizes der Granulopoese (in %) )

|                   | 0 h   | 24 Std |                        | 48 Std |                        | 72 Std |                           |
|-------------------|-------|--------|------------------------|--------|------------------------|--------|---------------------------|
|                   | Orig. | Kontr. | 1 E/ml<br>ESF "London" | Kontr. | 1 E/ml<br>ESF "London" | Kontr. | 1 E/ml<br>ESF<br>"London" |
| Fall I            | 14,8  | 11,9   | 17,4                   | 12,9   | 11,1                   | 10,2   | 9,0                       |
| Fall II           | 13,6  | 10,2   | 12,1                   | 11,5   | 7,6                    | 5,7    | 9,7                       |
| Fall III          | 22,8  | 20,5   | 16,9                   | 11,1   | 15,0                   | 6,1    | 9,1                       |
| arithm.<br>Mittel | 17,1  | 14,2   | 15,5                   | 11,8   | 11,2                   | 7,3    | 9,3                       |
|                   | Orig. | Kontr. | 1,8 E/ml<br>"Toronto"  | Kontr. | 1,8 E/ml<br>"Toronto"  | Kontr. | 1,8 E/ml<br>"Toronto"     |
| Fall V            | 14,2  | 14,3   | 17,2                   | 10,3   | 12,0                   | 12,5   | 8,9                       |
| Fall VI           | 6,5   | 16,8   | 11,5                   | 12,6   | 11,6                   | 6,9    | 9,3                       |
| Fall IV           | 7,0   | 15,2   | 7,7                    | 7,7    | 6,2                    | 7,1    | 8,6                       |
| arithm.<br>Mittel | 9,2   | 15,4   | 12,1                   | 10,2   | 9,9                    | 8,8    | 8,9                       |

Tabelle VII: Signifikanzberechnung der Mitosen der Erythropoese, Fall I - III

|      |                      | Zahl d. Mitosen | Z.d.teilungsf.Zellen | $\chi^2$ | P           |
|------|----------------------|-----------------|----------------------|----------|-------------|
| 24 h | Kontr.               | 14              | 1237                 | 4,12     | <u>0,04</u> |
|      | ESF-Zusatz<br>London | 29              | 1342                 |          |             |
| 48 h | Kontr.               | 11              | 1112                 | 2,14     | 0,14        |
|      | ESF-Zusatz<br>London | 22              | 1309                 |          |             |
| 72 h | Kontr.               | 5               | 949                  | 3,297    | 0,07        |
|      | ESF-Zusatz<br>London | 18              | 1411                 |          |             |

Tabelle VIII: Signifikanzberechnung der Mitosen der Erythropoese, Fall IV - VI

|      |                | Mitosen | Teilungsfähige Zellen | $\chi^2$ | P            |
|------|----------------|---------|-----------------------|----------|--------------|
| 24 h | Kontr.         | 29      | 1660                  | 1,386    | 0,24         |
|      | ESF<br>Toronto | 30      | 1269                  |          |              |
| 48 h | Kontr.         | 10      | 907                   | 4,86     | <u>0,025</u> |
|      | ESF<br>Toronto | 20      | 794                   |          |              |
| 72 h | Kontr.         | 3       | 638                   | 3,175    | 0,08         |
|      | ESF<br>Toronto | 8       | 545                   |          |              |

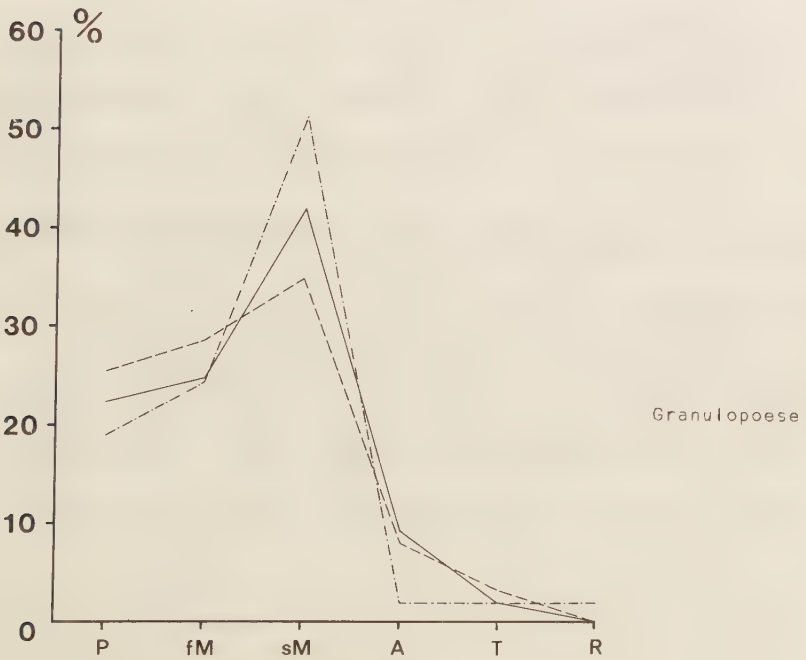
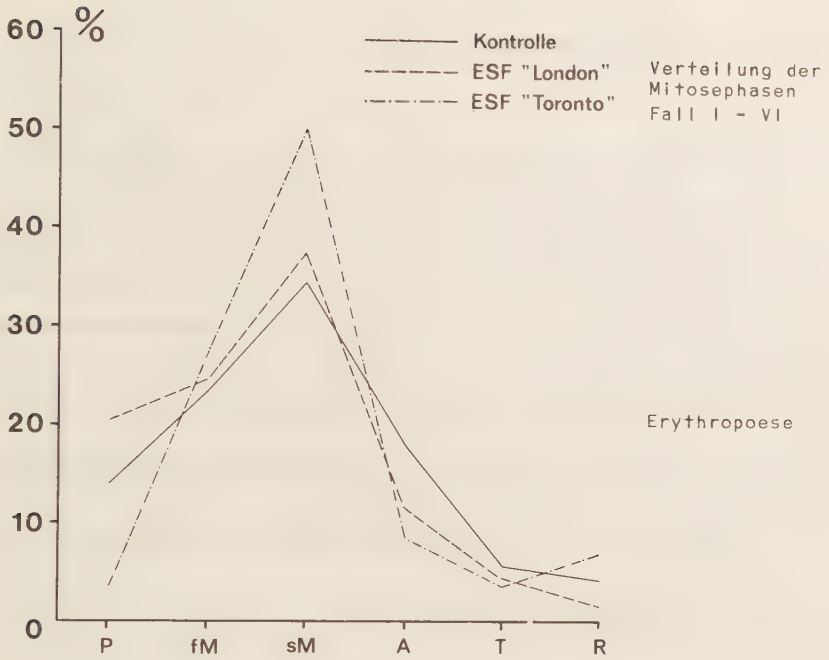


Tabelle IX: G/E-Indices der Fälle I - III

|                   | 0 h   | 24 h   |                        | 48 h   |                        | 72 h   |                           |
|-------------------|-------|--------|------------------------|--------|------------------------|--------|---------------------------|
|                   | Orig. | Kontr. | 1 E/ml<br>ESF "London" | Kontr. | 1 E/ml<br>ESF "London" | Kontr. | 1 E/ml<br>ESF<br>"London" |
| Fall I            | 2,3   | 1,1    | 2,2                    | 1,7    | 1,8                    | 1,6    | 1,2                       |
| Fall II           | 2,5   | 1,4    | 1,6                    | 2,0    | 1,8                    | 1,7    | 0,6                       |
| Fall III          | 2,2   | 1,8    | 1,4                    | 1,6    | 1,3                    | 1,9    | 0,9                       |
| arithm.<br>Mittel | 2,3   | 1,4    | 1,7                    | 1,8    | 1,5                    | 1,7    | 0,9                       |

Tabelle X: G/E-Indices der Fälle IV - VI

|                   | 0 h   | 24 h   |                              | 48 h   |                              | 72 h   |                              |
|-------------------|-------|--------|------------------------------|--------|------------------------------|--------|------------------------------|
|                   | Orig. | Kontr. | 1,8 E/ml<br>ESF<br>"Toronto" | Kontr. | 1,8 E/ml<br>ESF<br>"Toronto" | Kontr. | 1,8 E/ml<br>ESF<br>"Toronto" |
| Fall IV           | 2,8   | 1,3    | 1,9                          | 1,1    | 1,9                          | 3,8    | 1,7                          |
| Fall V            | 1,8   | 1,0    | 1,4                          | 2,5    | 1,4                          | 1,3    | 1,6                          |
| Fall VI           | 1,7   | 0,5    | 1,1                          | 1,6    | 1,3                          | 1,0    | 1,5                          |
| arithm.<br>Mittel | 2,1   | 0,9    | 1,5                          | 1,7    | 1,5                          | 2,0    | 1,6                          |

In den Kulturen mit ESF "Toronto" kommt es in zwei Fällen bei 48 Std und in einem bei 72 Std zu einer Verminderung des G/E-Index.

#### F. Ergebnis der Retikulozytenzählung

Die zwei zur Retikulozytenzählung ausgewählten Fälle unterscheiden sich im Retikulozytengehalt des peripheren Blutes stark (Tab. XI). Im Knochenmark liegt dagegen in beiden Fällen die Zahl der Retikulozyten zur Stunde Null mit 230 ‰ (Fall IV) bzw. 336 ‰ (Fall VI) weit höher als von REGENSBURGER beschrieben (68).

Bei Fall IV nehmen die Retikulozyten von 24 bis 72 Std zu, wobei nach 24 und 48 Kulturstunden die Werte in der Zusatzkultur höher als in der Kontrollkultur sind. Nach 72 Std liegt jedoch der Wert in der Kontrollkultur höher.

In Fall VI nimmt die Retikulozytenzahl vom Ausgangswert bis zur 48-Stundenkultur zu und sinkt nach 72 Std wieder ab. Ein Unterschied zwischen den Werten der Zusatz- und der Kontrollkultur liegt nicht vor.

Tabelle XI: Retikulozytenzahlen bei Fall IV und

Fall VI in ‰

|         | periph.<br>Blut | 0 h      | 24 h   |              | 48 h   |              | 72 h   |              |
|---------|-----------------|----------|--------|--------------|--------|--------------|--------|--------------|
|         |                 | Original | Kontr. | ESF-<br>Zus. | Kontr. | ESF-<br>Zus. | Kontr. | ESF-<br>Zus. |
| Fall IV | 10              | 230      | 212    | 248          | 322    | 360          | 346    | 324          |
| Fall VI | 64              | 336      | 374    | 376          | 418    | 414          | 360    | 366          |

# G. Retikulumzellen und Lymphozyten (Tabelle XIII u. XIV)

Aus den Differentialzählungen der Kontroll- und Zusatzkulturen werden die Zahlen der großen und kleinen Retikulumzellen und der Lymphozyten entnommen und auf ‰ der Gesamtzellzahl umgerechnet.

Dabei wird unter Zusatz von ESF "London" bei allen drei Zellarten in Fall I eine leichte Abnahme, in Fall III eine leichte Zunahme und in Fall II nur eine Zunahme der Lymphozyten und Abnahme der großen Retikulumzellen beobachtet, während die kleinen Retikulumzellen praktisch fehlen.

Unter Zusatz von ESF "Toronto" nimmt die Zahl der Lymphozyten in zwei Fällen ab und ebenso die der großen Retikulumzellen. Die kleinen Retikulumzellen dagegen nehmen leicht zu.

## H. "Übergangszellen"

Die Zahlen der in Fall I mitgezählten "Übergangszellen" betragen:

Tabelle XII

| 0 h      |         | 24 h    |        | 48 h  |        | 72 h |  |
|----------|---------|---------|--------|-------|--------|------|--|
| Original | Kontr.  | ESF     | Kontr. | ESF   | Kontr. | ESF  |  |
| 2        | 3       | 3       | 4      | 2     | 0      | 0    |  |
| = 1 ‰    | = 1,5 ‰ | = 1,5 ‰ | = 2 ‰  | = 1 ‰ | 0      | 0    |  |

Die ‰ beziehen sich auf die gesamten 2.000 Zellen eines Präparates.

Tabelle XIII: Angaben der Lymphozyten, kleinen und großen Retikulumzellen (in %) bei Fall I - III

|      |            |         | Fall I | Fall II | Fall III | arithm. Mittel |
|------|------------|---------|--------|---------|----------|----------------|
| 0 h  | Original   | Ly.     | 38,0   | 75,5    | 48,0     | 53,8           |
|      |            | kl.R.Z. | 8,5    | -       | 18,0     | 8,8            |
|      |            | gr.R.Z. | 34,0   | 34,5    | 21,0     | 29,8           |
| 24 h | Kontr.     | Ly.     | 70,5   | 92,4    | 51,5     | 71,5           |
|      |            | kl.R.Z. | 2,5    | -       | 2,0      | 1,5            |
|      |            | gr.R.Z. | 34,5   | 33,8    | 10,0     | 26,1           |
|      | ESF-Zusatz | Ly.     | 57,0   | 121,5   | 57,5     | 78,7           |
|      |            | kl.R.Z. | 7,5    | 1,0     | 9,5      | 6,0            |
|      |            | gr.R.Z. | 30,0   | 15,8    | 12,5     | 19,4           |
| 48 h | Kontr.     | Ly.     | 67,5   | 55,4    | 68,5     | 63,8           |
|      |            | kl.R.Z. | 16,0   | -       | 7,0      | 7,7            |
|      |            | gr.R.Z. | 29,5   | 35,4    | 11,0     | 25,3           |
|      | ESF-Zusatz | Ly.     | 71,0   | 161,5   | 65,5     | 99,3           |
|      |            | kl.R.Z. | 3,5    | -       | 9,0      | 4,2            |
|      |            | gr.R.Z. | 15,0   | 29,0    | 20,0     | 21,3           |
| 72 h | Kontr.     | Ly.     | 69,8   | 118,5   | 87,0     | 91,8           |
|      |            | kl.R.Z. | 8,6    | -       | 4,5      | 4,4            |
|      |            | gr.R.Z. | 10,5   | 44,0    | 17,5     | 24,0           |
|      | ESF-Zusatz | Ly.     | 59,0   | 133,5   | 88,5     | 93,7           |
|      |            | kl.R.Z. | 11,5   | 1,0     | 0,5      | 4,3            |
|      |            | gr.R.Z. | 18,5   | 37,5    | 12,0     | 22,7           |

Tabelle XIV: Angaben der Lymphozyten, kleinen und großen Retikulumzellen (in %) bei Fall IV - VI

|      |            |         | Fall IV | Fall V | Fall VI | arithm.Mittel |
|------|------------|---------|---------|--------|---------|---------------|
| 0 h  | Original   | Ly.     | 58,5    | 36,5   | 87,0    | 60,7          |
|      |            | kl.R.Z. | 5,0     | 3,5    | 14,0    | 7,5           |
|      |            | gr.R.Z. | 8,0     | 7,0    | 4,0     | 6,3           |
| 24 h | Kontr.     | Ly      | 59,5    | 56,5   | 57,5    | 57,8          |
|      |            | kl.R.Z. | 0,5     | -      | -       | 0,16          |
|      |            | gr.R.Z. | 4,0     | 7,5    | 8,0     | 6,5           |
|      | ESF-Zusatz | Ly      | 64,0    | 57,0   | 67,0    | 62,7          |
|      |            | kl.R.Z. | 1,5     | 2,5    | -       | 1,3           |
|      |            | gr.R.Z. | 4,5     | 9,0    | 10,0    | 7,8           |
| 48 h | Kontr.     | Ly.     | 42,5    | 63,0   | 99,0    | 68,2          |
|      |            | kl.R.Z. | -       | -      | -       | -             |
|      |            | gr.R.Z. | 3,5     | 4,0    | 12,5    | 6,7           |
|      | ESF-Zusatz | Ly.     | 68,5    | 50,5   | 73,5    | 64,2          |
|      |            | kl.R.Z. | -       | -      | -       | -             |
|      |            | gr.R.Z. | 6,5     | 2,0    | 4,5     | 4,3           |
| 72 h | Kontr.     | Ly.     | 116,0   | 60,0   | 67,0    | 81,0          |
|      |            | kl.R.Z. | 2,0     | 1,0    | -       | 1,0           |
|      |            | gr.R.Z. | 8,0     | 4,0    | 6,5     | 6,2           |
|      | ESF-Zusatz | Ly.     | 72,5    | 63,0   | 103,0   | 79,5          |
|      |            | kl.R.Z. | 5,5     | -      | 1,0     | 2,2           |
|      |            | gr.R.Z. | 4,5     | 6,0    | 4,0     | 4,9           |

#### IV. Diskussion

An sechs Koagulumkulturen von menschlichem Knochenmark wird der direkte Einfluß von Erythropoietin auf die Knochenmarkzellen drei Tage lang untersucht.

Die zelluläre Zusammensetzung des Knochenmarks hängt von der Regeneration und Differenzierung der Knochenmarkzellen ab. Beide kann man mit dem Begriff "Proliferationsaktivität" zusammenfassen. Wenn Erythropoietin einen direkten Einfluß auf Erythroblasten hat, dann in erster Linie auf ihre Proliferationsaktivität. Als Maßstab dafür dienen uns die Mitoseindices, die karyologischen Kurven und die Reifungskurven, die G/E-Indices, die Retikulozyten-, Lymphozyten- und Retikulumzellzählung.

Von allen Autoren, welche sich mit der ESF-Wirkung am Knochenmark beschäftigen, bedienen sich besonders MATOTH und Mitarbeiter 1958/62 (56) und auch NECHELES und Mitarbeiter 1968 (61) der Differentialzählung als Auswertungsmethode. Sie kultivieren das Knochenmark in Suspensionskulturen und beobachten eine Steigerung der mitotischen Aktivität und Beschleunigung der Ausreifung.

Die meisten anderen Autoren stützen ihre Ergebnisse auf den Einbau von markiertem Eisen in Hämoglobin, obwohl dabei nicht ganz sicher ist, ob das bestimmte Eisen im Häm eingebaut ist oder nur im Knochenmark gespeichert wird. Als Ergebnisse sehen diese Autoren eine, mit der

Erythropoietindosis parallel ansteigende  $\text{Fe}^{59}$ -Inkorporationsrate.

ENGELBRECHT und REMMELE (18) stellen bei In vitro Versuchen mit ESF eine dosisabhängige Anregung der Retikulozytenreifung fest, ohne Veränderung der prozentualen Anteile der verschiedenen Reifestadien.

Andere Untersucher stellen nach Stimulierung der Erythropoese eine Abnahme der Lymphozyten (80) und Zellen des RES fest (46), wobei sie diese Zellen als Stammzellen und Vorläufer der Erythropoese ansehen.

Durch ESF soll die "determinierte" Stammzelle (je nach Ansicht dem RES oder der Lymphopoese entstammend) zur Differenzierung in Proerythroblasten angeregt werden, der Mitoseindex der Erythroblasten ansteigen, die Hb-Synthese stimuliert werden und es zur Vermehrung der Retikulozyten kommen.

In unseren Untersuchungen können wir folgende Punkte bestätigen:

1.) Der rote Mitoseindex steigt an, jedoch nach statistischen Untersuchungen mittels  $\chi^2$ -Test nicht sicher signifikant. Da die karyologische Kurve unverändert bleibt, bedeutet dies eine Steigerung der Regeneration der Erythropoese.

Diese Wirkung ist bei beiden verwendeten Erythropoietinpräparaten und bei beiden angewandten Konzentrationen (1 E/ml und 1,8 E/ml) sowohl an annähernd normalem Knochenmark als auch an Mark nephrogener Anämien zu beobachten.

Obwohl bei letzteren ein Mangel körpereigenen Erythropoietins vorausgesetzt werden kann (24), ist der Effekt hierbei nicht stärker.

2.) Die Reifung in der Erythropoese wird gefördert, wobei sie durch Erythropoietin "London" schon nach 24 Std beschleunigt ist und besonders die basophilen Erythroblasten vermindert werden. Durch ESF "Toronto" wird die Reifung dagegen erst nach 48 und 72 Std angeregt. Die Reifungsförderung dürfte Ausdruck einer zunehmenden Hämoglobinsynthese sein. Dabei scheint die Reifung bis zu den Erythrozyten fortzuschreiten, da 24 Std nach Zusatz beider Erythropoietine die Erythroblasten relativ abnehmen, was in einer Erhöhung des G/E-Index zum Ausdruck kommt. Nach 48 bis 72 Std nimmt der G/E-Index wieder ab, nicht nur bei ESF "London", bei dem die Reifung nur nach 24 Std beschleunigt ist, sondern auch bei ESF "Toronto", welches nach der Reifungskurve eine Reifungsbeschleunigung erst zu diesen Zeiten ausübt. Es muß hierbei an eine Entkernungsstörung der reifen Erythroblasten gedacht werden.

Die Retikulozytenzählung zeigt in unserem Kultursystem eine Veränderung durch ESF "Toronto" nur in einem der beiden untersuchten Fälle (Fall IV), bei dem in vivo nicht stimulierten Knochenmark (10 % Retikulozyten im peripheren Blut). Die Retikulozytenvermehrung ist wegen der hohen Ausgangswerte allerdings wenig überzeugend. Bei dem Patienten mit erhöhter Retikulozytenzahl im peripheren

Blut (Fall VI, 64 %) kann die in vivo bereits bestehende Stimulierung der Erythropoiesereifung durch den Erythropoietinzusatz offenbar nicht weiter angeregt werden. Auch die Reifungskurve (Abb. 7) zeigt keine überzeugende Veränderung. Nur die Regeneration ist in vitro weiter stimulierbar (Tab. V).

Damit stehen wir teilweise im Gegensatz zu ENGELBRECHT und REMMELE mit ihren in vitro Versuchen (18) und anderen Autoren mit ihren Ergebnissen bei in vivo Versuchen (39, 44).

Allerdings berichten auch GALLAGHER et al. von Versuchen, bei denen eine Stimulierung der Retikulozyten weder in vitro noch in vivo gelingt (33).

Die Retikulumzellen und die Lymphozyten werden durch ESF nicht in ihrer Relativverteilung verändert. Ebenso wird die "Übergangszelle", welche nach BOLL (8) morphologisch und funktionell zwischen großer Retikulumzelle und Proerythroblast steht und möglicherweise die "determinierte" Stammzelle darstellt, in unserem Versuch durch Erythropoietin nicht vermehrt. Die Vorstellung, daß die "determinierte" Stammzelle morphologisch schon erkennbar ist, kann somit nicht belegt werden.

Die Zahl der Retikulumzellen kann jedoch keinen sicheren Anhalt über ihre wahre Häufigkeit im Knochenmark geben, da bevorzugt in den an hämopoetischen Zellen reichen und an Retikulumzellen armen Randpartien der Präparate gezählt wird. Sind die Präparate weniger gut auswertbar, muß

auch in den zentralen, an Retikulumzellen reichen Zonen gezählt werden, wodurch deren Zahlen ansteigen.

Zu überlegen wäre, ob man aufgrund der Beobachtungen von NECHELES (60) durch Zusatz von Etiocholanolon, welches die Erythropoietinsensibilität der "determinierten" Stammzelle erhöht, die Beeinflussbarkeit dieser Zellen in unserem System verbessern könnte.

Da mit beiden Erythropoietinpräparaten keine Vermehrung der Proerythroblasten auftritt, taucht die Frage auf, ob die "determinierte" Stammzelle möglicherweise in unseren Knochenmarkkulturen, also im Knochenmarkpunktat gar nicht enthalten ist.

Auch NECHELES und Mitarbeiter können 1968 keine meßbare Stammzelldifferenzierung in menschlichen Knochenmarkkulturen unter ESF beobachten (61).

In unseren Versuchen zeigen sich aber nach Erythropoietinzusatz auch in der Granulopoese Veränderungen. So wird sowohl unter ESF "London" als auch unter ESF "Toronto" die Reifung der granulopoetischen Zellen angeregt. Die Mitosehäufigkeit ändert sich nicht. Wenn auch POWSNER und BERMAN (1967) über eine Anregung der Reifung und eine Zellvermehrung in der Granulopoese berichten (65), herrscht doch in der Literatur die Ansicht vor, daß bei Anregung der Erythropoese durch ESF die weiße Reihe gehemmt wird. Die Ergebnisse von BOLL (7) an haemolytischen Anämien sprechen allerdings gegen diese Annahmen, findet man doch bei maximal stimulierter Erythropoese hierbei die Regeneration und Reifung in vitro auch maximal stimuliert. Durch die Erythropo-

ietine wird jedoch nur die Reifung signifikant gefördert, nicht aber die Regeneration. Die meisten Autoren untersuchen allerdings die Wirkung von Erythropoietin auf die Granulopoese nicht.

Alle Veränderungen an den Knochenmarkkulturen nach Erythropoietinzusatz sind weniger ausgeprägt, als nach der Literatur zu erwarten gewesen wäre. Dies könnte liegen an:

- 1.) ungeeigneten Knochenmarkproben
- 2.) zu kurzer Versuchsdauer
- 3.) Unterdosierung der Erythropoietinzusätze
- 4.) Überalterung der Substanzen
- 5.) unspezifischen Verunreinigungen

ad 1.) Es werden Knochenmarkproben zweier verschiedener Patientengruppen verwendet, welche sich in Kultur nicht wesentlich verschieden verhalten. Eine Gruppe hat annähernd normales Mark, dabei erscheint unwahrscheinlich, daß eine weitere Stimulation der Erythropoese nicht möglich gewesen wäre. Das Kulturmodell als solches ist geeignet, was die Stimulierung der Erythropoese durch eine Kobaltverbindung zeigt (54).

ad 2.) Ein Autor berichtet, daß die ESF-Wirkung schon nach zwei Stunden nachgewiesen werden kann (61). Verglichen damit erscheint unsere Versuchsdauer von 72 Stunden ausreichend. Nach längerer Zeit ist das Experiment wegen des dann vermehrt auftretenden Zelltods in unserem Kultursystem ohne Aussagewert.

ad 3.) Erfahrungsgemäß erfordert der *in vitro* Versuch höhere ESF-Konzentrationen als der Tierversuch (48). Die Dosierung von 1 E/ml bzw. 1,8 E/ml Erythropoietin müßte dennoch ausreichend sein, da andere Autoren bei ähnlichen Dosierungen *in vitro* eine ESF-Wirkung feststellen konnten (20, 48).

ad 4.) WOLTERS stellt fest, daß erythropoietinreicher Alkoholextrakt aus dem Plasma anämisierter Kaninchen bei Lagerung in der Tiefkühltruhe nach einem Jahr einen Aktivitätsverlust von 30 % zeigt (78). Trockensubstanzen sollen stabiler sein. Die "International Reference Preparation" (= ESF "London") zeigt dagegen selbst nach zwei Jahren Lagerung bei 20° C keinen meßbaren Aktivitätsverlust (15). In unseren Untersuchungen kommt ESF "Toronto" (Schaferythropoietin Step I) nach ca. zwei Jahren, ESF "London" ca. vier Monate nach Erhalt zur Anwendung. Bei ersterem könnte danach schon ein Aktivitätsverlust eingetreten sein.

ad 5.) Nach GOLDWASSER können unspezifische Verunreinigungen die Wirkung von ESF beeinträchtigen (38). Nach COTES (London) wäre zu überlegen, ob in dem Londoner Präparat solche Substanzen enthalten sind, die gleichzeitig toxisch auf die Kultur wirken. In den Zusatzkulturen finden sich allerdings nicht vermehrt degenerierte Zellen.

#### V. Zusammenfassung

An Knochenmarkkoagulumkulturen von drei Patienten ohne hämatologische Erkrankungen und drei Patienten mit nephrogener Anämie wird die Wirkung von Erythropoietin in vitro mittels Differentialzählungen untersucht.

Zur Anwendung kommen:

- 1.) Die "International Reference Preparation of Erythropoietin" in einer Konzentration von 1 E/ml.
- 2.) Ein Schaferythropoietin Step 1 in einer Konzentration von 1,8 E/ml.

Unter beiden ESF-Präparaten kommt es zu einer Steigerung der Regeneration und zu einer signifikanten Anregung der Reifung in der Erythropoese, was durch die Parameter Mitose- und G/E-Index, karyologische Kurven und Reifungskurven dargestellt wird.

Ebenfalls wird in der Granulopoese die Reifung angeregt.

## VI. Literatur

1. ADAMSON, J. W., R. ALEXANIAN, C. MARTINEZ and  
C. A. FINCH:  
Erythropoietin excretion in normal man.  
Blood 28, 354 (1966)
2. ALEXANIAN, R. : Urinary excretion of erythropoietin  
in normal men and women.  
Blood 28, 344 (1966)
3. ALPEN, E. L., D. CRANMORE and M. E. JOHNSTON:  
Early observation on the effects of  
blood loss.  
In: L. O. Jacobson and M. Doyle:  
Erythropoiesis (Grune and Stratton,  
New York - London 1962)
4. BELITZ, H. J. : Die Anwendung statistischer Methoden  
in der Biologie.  
In: Der Mathematikunterricht, Ernst  
Klett Verlag Stuttgart, Heft 3, 83  
(1960)
5. BOLL, I. : Morphologische Studien zum Verhalten  
von Knochenmarkzellen in vitro. I. Gra-  
nuloblastenmitosen.  
Folia haemat. 3, 58 (1958)
6. BOLL, I. : Granulozytopoese unter physiologischen  
und pathologischen Bedingungen.  
(Springer Verlag, Heidelberg 1966)
7. BOLL, I. : Kinetics of the granulocytopoiesis in  
hemolytic anemias.  
1. Meeting Europ. Div. Internat. Soc.  
Haemat. (Mailand 1971)

8. BOLL, I. : Mündliche Mitteilung (1971)
9. BOLL, I. und G. MERSCH : Morphologische Untersuchungen zur Proliferationskinetik der normalen und pathologischen Erythropoese in vitro.  
Blut XVII, 193 (1968)
10. BONSDORFF, E. and E. JALAVISTO:  
A humoral mechanism in anoxic erythrocytosis.  
Acta physiol. scand. 16, 150 (1948)
11. BORSOOK, H., K. RATNER, B. TATTRIE, D. TEIGLER and L. G. LAJTHA:  
Erythropoietin and the development of erythrocytes.  
Nature 217, 1024 (1968)
12. BRECHER, G. : The macrocytic response to erythropoietin stimulation.  
F. STOHLMAN jr. In: L. O. Jacobson and M. Doyle: Erythrocytopoiesis. (Grune and Stratton, New York - London 1962)
13. BRUCE, W. R. and E. A. McCulloch:  
The effect of erythropoietic stimulation on the hemopoietic colony-forming cells of mice.  
Blood 23, 216 (1964)
14. CARNOT, M. P. et Cl. DEFLANDRE:  
Sur l'activité hémopoïétique des différents organes au cours de la régénération du sang.  
C. R. Acad. Sci. (Paris) 143, 432 (1906)

15. COTES, P. M. : The International Reference Preparation of Erythropoietin.  
and D. R. BANGHAM Bull. Org. mond. Santé 35, 751 (1966)
16. DUKES, P. P. : On the utilization of erythropoietin.  
and In: L. O. Jacobson and M. Doyle:  
E. GOLDWASSER Erythropoiesis (Grune and Stratton,  
New York - London 1962)
17. DUKES, P. P. : On the mechanism of erythropoietin-  
and induced differentiation. III. The  
E. GOLDWASSER nature of erythropoietin action on  
 $C^{14}$  glucosamine incorporation by  
marrow cells in culture.  
Biochem. biophys. Acta 108, 447  
(1965)
18. ENGELBRECHT, H. M. und W. REMMELE:  
Der Einfluß von Erythropoietin und  
somatotropem Hormon auf die Retikulo-  
zyten-Reifungszeit in vitro.  
Blut XIX, 385 (1969)
19. ERSLEV, A. J. : Erythropoietin in vitro.  
In: L. O. Jacobson and M. Doyle:  
Erythropoiesis (Grune and Stratton,  
New York - London 1962)
20. ERSLEV, A. J. : Effect of erythropoietin on the up-  
take and utilization of iron by bone  
marrow cells in vitro.  
Proc. Soc. Exp. Biol. 110, 615 (1962)
21. ERSLEV, A. J. : Erythropoietin in vitro. II. Effects  
on stem cells.  
Blood 24, 331 (1964)
22. ERSLEV, A. J. : Renal production of erythropoietin.  
and L. A. KAZAL Sympos. Erythropoietic. Prag 1970,  
S. 7

23. ESSERS, U. : Erythropoietin.  
Dtsch. med. Wschr. 52, 2535 (1968)
24. FINNE, P. H. : Fetal hypoxia and anemic uremic patients.  
Ann. N. Y. Acad.Sci. 149, 497 (1968)
25. FISHER, J. W., R. SCHOFIELD and D. D. PORTEOUS:  
Effect of renal hypoxia on erythropoietin production.  
Brit. J. Haemat. 11, 382 (1965)
26. FISHER, J. W. : Relationship between renal blood-flow  
and erythropoietin production in dogs.  
A. I. SAMUELS Proc. Soc. Exp. Biol. 125, 482 (1967)
27. FRIED, W. : Studies on extrarenal erythropoietin  
production.  
Sympos. Erythropoietic. Prag 1970, S.11
28. FRIEDERICI, L. : Untersuchungen zum Nachweis eines ery-  
thropoetischen Wirkstoffs (Erythropoie-  
tin) im Blut.  
Folia haemat. N.F. 7, 192 (1963)
29. FRIEDERICI, L. : Erythropoietin. Untersuchungen über  
und einen die Erythropoese steigenden  
E.F. GERSMEYER Wirkstoff bei Blutkrankheiten.  
Med. Welt (1960) S. 2669
30. GABUZDA, T. G., H. E. SHUTE and A. J. ERSLEY:  
Regulation of erythropoiesis in ery-  
throleukemia.  
Arch. Intern. Med. 123 (1969)
31. GABUZDA, T. G., H. B. LEWIS and R. K. SILVER:  
Biochemical studies of cultured  
erythroid cells.  
Sympos. Erythropoietic. Prag 1970, S. 12

32. GALLAGHER, N. I., I. M. Mc CARTHY, K. T. HART and  
R. D. LANGE : Evaluation of plasma erythropoietic-  
stimulating factors in anemic uremic  
patients.  
Blood 14, 1 662 (1959)
33. GALLAGHER, N. I., A. A. MAES and R. D. LANGE:  
Influence of erythropoietin on  
erythropoiesis.  
9. Intern. Haematol.-Kongress  
Mexico City 1962, Heft 5
34. GALLIEN-LARTIGUE, O. and E. GOLDWASSER:  
Hemoglobin synthesis in marrow cell  
culture: The effect of rat plasma  
on rat cells.  
Science 145, 277 (1964)
35. GARCIA, J. F. : Erythropoietic stimulation in the  
and hypertransfused guinea-pig following  
J. C. SCHOOLEY Injections of human urinary erythro-  
poietin.  
Nature 196, 4851 (1962)
36. GEIGY DOCUMENTA, Wissenschaftliche Tabellen.  
J. R. Geigy, Basel 1968
37. GOLDWASSER, E. : Chemistry and purification of ery-  
and thropoietin.  
C. K. H. KUNG Ann. N. Y. Acad. Sci. 149, 49 (1968)
38. GOLDWASSER, E. : zit. nach P. M. COTES:  
In: Current topics in developmental bio-  
logy. (A. Monroy and A. A. Moscona eds.)  
Academic Press New York 1966, S. 173
39. GORDON, A. S. : Assay of the erythropoietic stimulating  
and factor (ESF).  
A. H. WEINTRAUB In: L. O. Jacobson and M. Doyle:  
Erythropoiesis (Grune and Stratton  
New York - London 1962)

40. GORDON, A. S. : Biogenesis of erythropoietin.  
and Sympos. Erythrop. Prag 1970,  
E. D. ZANJANI S. 15
41. GROSS, M. : On the mechanism of erythropoietin  
and Induced differentiation. V. Charac-  
E. GOLDWASSER terization of the ribonucleic acid  
formed as a result of erythropoietin  
action.  
Biochemistry 8, 1795 (1969)
42. GURNEY, C. W., R. DEGOWIN, D. HOFSTRA and J. BYRON:  
Applications of erythropoietin to  
biological investigation.  
In: L. O. Jacobson and M. Doyle:  
Erythropoiesis (Grune and Stratton,  
New York - London 1962)
43. HASEGAWA, M., Y. MATSUKI, S. OZAWA and Y. ANDO:  
The role of erythropoietin in a-  
plastic anemia. Some aspects for  
etiology and treatment of aplastic  
anemia.  
Keio J. Med. 17, 109 (1968)
44. HODGSON, G. : Effects of plasma erythropoiesis  
stimulating factor (ESF) at different  
time intervals after single injection.  
Proc. Soc. Exp. Biol. 106, 766 (1961)
45. HRINDA, M. E. : Part VII. In vitro studies on erythro-  
and poietin. Studies on the control of he-  
E. GOLDWASSEF moglobin formation in marrow cells.  
Ann. N. Y. Acad. Sci. 149, 412 (1968)
46. KORST, D. R. : Humoral effects on marrow cell diffe-  
and rentiation.  
J. QUIRK Ann. N. Y. Acad. Sci. 149, 236 (1968)

47. KRANTZ, S. B., O. GALLIEN-LARTIGUE and E. GOLDWASSER:  
The effect of erythropoietin upon  
heme synthesis by marrow cells in  
vitro.  
J. biol. chem. 238, 4085 (1963)
48. KRANTZ, S. B. : Response of polycythemia vera marrow  
to erythropoietin in vitro.  
J. Lab. clin. Med. 71, 999 (1968)
49. KRETSCHMAR, A. L.: Erythropoietin: Hypothesis of action  
tested by analog computer.  
Science 152, 367 (1966)
50. KUBANEK, B., W. S. TYLER, L. FERRARI, D. HOWARD und F.  
STOHLMAN jr. : Die Wirkung von Erythropoietin auf  
die hämopoetische Stammzelle.  
Verhandig. 13. Tagung Dtsch. Ges.  
Hämat. 8, 26 (1969)
51. KUBANEK, B. : Erythropoietin: The haematologist's  
hormone.  
Hormone Metabol. Res. 1, 151 (1969)
52. KURATOWSKA, Z. : Renal erythropoietic factor.  
and M. KOPEC Brit. J. haemat. (1969)
53. LAJTHA, L. G. : Stem cell kinetics and erythropoietin.  
In: L. O. Jacobson and M. Doyle:  
Erythropoiesis (Grune and Stratton,  
New York - London 1962).
54. LÖCHTE, K.-H. : Der Einfluß von Eisen und Kobalt auf  
menschliches Knochenmark in vitro.  
Med. Diss. F. U. Berlin 1971
55. MATOTH, Y., N. BIEZUNSKI and G. SZABO:  
Effect of sera from patients with  
anoxia on the growth of erythro-  
poietic tissue in vitro.  
Internat. Kongr. Hemat. Proc. VI,  
776 (1958)

56. MATOTH, Y. : In vitro methods in the study of erythropoietin.  
In: L. O. Jacobson and M. Doyle: Erythropoiesis (Grune and Stratton, New York - London 1962)
57. NAETS, J. P. : Internal regulatory mechanisms of erythropoiesis.  
Euratom Contact Group Meeting, Hinterzarten (1966)
58. NAETS, J. P. : Erythroid marrow and erythropoietin utilization.  
M. WITTEK Sympos. Erythrop. Prag 1970, S. 39
59. NATHAN, D. G., E. SCHUPAK, F. STOHLMAN jr. and J.P. MERRILL : Erythropoiesis in anephric man.  
J. clin. Invest. 43, 2158 (1964)
60. NECHELES, T. F. : Studies on the control of hemoglobin synthesis: The in vitro effects of androgens and erythropoietin.  
Sympos. Erythrop. Prag 1970, S. 40
61. NECHELES, T. F., R. G. SHEEHAN and H. J. MEYER: Studies on the control of hemoglobin synthesis: Nucleic acid synthesis and normoblast proliferation in the presence of erythropoietin.  
Ann. N. Y. Acad. Sci. 149, 449 (1968)
62. ORTEGA, J. A. : Erythropoietin effect on marrow and cultures with DNA synthesis depressed by cytosin-arabinoside.  
P. P. DUKES Federation Proc. 28, 600 (1969)

63. POWSNER, E. R. : The effect of erythropoietin on  
and erythroblast maturation in bone  
L. BERMAN marrow cultures.  
In: L. O. Jacobson and M. Doyle:  
Erythropoiesis (Grune and Stratton,  
New York - London 1962)
64. POWSNER, E. R. : Erythropoietin induced DNA syn-  
and thesis in normoblasts in vitro.  
L. BERMAN Am. J. Clin. Path. 47, 385 (1967)
65. POWSNER, E. R. : Effect of erythropoietin on DNA  
and synthesis by erythroblasts in vitro.  
L. BERMAN Blood 30, 189 (1967)
66. RAMBACH, W.A., J. A. D. COOPER and H. L. ALT:  
Purification of erythropoietin by  
Ironexchange chromatography.  
Proc. Soc. Exp. Biol. 98, 602 (1958)
67. REMMELE, W. : Erythropoietin.  
Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 74, 80  
(1968)
68. REGENSBURGER, R. : Die Veränderungen der Retikulozy-  
tenzahl in der Knochenmarkkoagu-  
lumkultur.  
Med. Diss. F. U. Berlin 1970
69. RUHENSTROTH-BAUER, G.: Zur Frage der Regelgröße des  
Erythropoeseregelkreises.  
In: Aktuelle Probleme der Nephrolo-  
gie. IV. Symposion der Gesellschaft  
für Nephrologie S. 298  
(F. Krück, Springer Verlag Berlin -  
Heidelberg - New York 1966)

70. SCHLUETER, R. J., H. NORGELLO and W. F. WHITE:  
zit. nach WOLTERS, H.-G.:  
Erythropoietin. I. Analysis of radio-  
Iron assay in fasted rats, using  
cobalt as a Reference Standard.  
Proc. Soc. Exp. Biol. 103, 43 (1960)
  
71. SCHULZ, E. : Die klinische Bedeutung des Ery-  
thropoetins.  
Der Internist 5, 210 (1971)
  
72. SCHROEDER, L. R., C. W. GURNEY and N. WACKMAN:  
Assay of erythropoietin in bone marrow  
suspensions.  
Nature 181, 1537 (1958)
  
73. STOHLMAN, F. jr. : Regulation of erythropoiesis.  
Trans. N. Y. Acad. Sci. 24, 312  
(1962)
  
74. STOHLMAN, F. jr., G. BRECHER and R. R. MOORES:  
Humoral regulation of erythropoiesis.  
VIII. The kinetics of red cell pro-  
duction and the effect of erythro-  
poietin.  
In: L. O. Jacobson and M. Doyle:  
Erythropoiesis (Grune and Stratton,  
New York - London 1962)
  
75. STOHLMAN, F. jr., S. EBBE, B. MORSE, D. HOWARD and  
J. DONOVAN : Regulation of erythropoiesis. XX.  
Kinetics of red cell production.  
Ann. N. Y. Acad. Sci. 149, 156 (1968)
  
76. STOHLMAN, F. jr. : Regulation of red cell production.  
Sympos. Erythrop. Prag 1970, S. 54

77. VAN DYKE, D., M. L. NOHR and J. H. LAWRENCE:  
Erythropoietin in the urine of  
normal and erythropoietically  
abnormal human beings.  
Blood 28, 535 (1966)
78. WOLTERS, H.-G. : Spezifische humorale Regulation  
der Erythropoese.  
Habilitationsschrift F. U. Berlin  
1970
79. WOLTERS, H.-G. : Zur Wirkung von Kobalt auf die  
Erythropoese.  
Blut XX (1970)
80. YOFFEY, I. M., R. U. JEFFREYS, D. G. OSMOND, M.S.  
TURNER, S. C. TAHSIN and P. A. R. NIVEN:  
Studies on hypoxia. VI. Changes  
in Lymphocytes and transitional  
cells in the marrow during the  
intensification of primary hypoxia  
and rebound.  
Ann. N. Y. Acad. Sci. 149, 179  
(1968)



Frau Professor Dr. med. Irene BOLL möchte ich  
meinen herzlichen Dank aussprechen für die  
Überlassung des Themas, die stets hilfreiche  
Unterstützung und das Interesse am Fortgang  
dieser Arbeit.

Für die wertvollen Hinweise bei der statistischen  
Auswertung der Ergebnisse danke ich Herrn Professor  
Dr. Bellitz.



Lebenslauf

Geboren am 24. Oktober 1940 in Kreuzburg/OS.

Von 1947 bis 1951 Besuch der Volksschule Denkendorf  
Kreis Esslingen.

Von 1951 bis 1960 Besuch des Mädchengymnasiums Ess-  
lingen a. N.

Reifeprüfung März 1960.

Beginn des Medizinstudiums in Tübingen im Mai 1960.

Vorphysikum Frühjahr 1961.

Physikum Herbst 1962.

Fortsetzung des Studiums in Innsbruck, Kiel, Hamburg  
und Tübingen.

Staatsexamen Frühjahr/Sommer 1966 in Tübingen.

Zwei Jahre Medizinalassistentenzeit in Neuenbürg,  
Freudenstadt, Bremen und Berlin.

Approbation am 28. Februar 1969.

Bis 28. Februar 1970 Tätigkeit als Assistentin an  
der Kinderklinik des Rudolf-Virchow-Krankenhauses  
Berlin.

Seit Oktober 1970 Doktorandin.



Studie im Rahmen der Assoziation Haematologie  
EURATOM-GSF, Nr. 031-64-1 BIAD, mit Unterstützung  
durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft





